



Universitat Autònoma
de Barcelona

ESCOLA D'ENGINYERIA

Departament d'Enginyeria Química

**Anàlisi quantitatiu de l'efecte de l'expressió
d'una lipasa recombinant sobre
el metabolisme central de *Pichia pastoris***

Memòria per optar al Grau de Doctor
per la Universitat Autònoma de Barcelona
sota la direcció dels doctors
Dr. Joan Albiol Sala
Dr. Pau Ferrer Alegre

Joel Jordà Murria

Bellaterra Març 2013

El Dr. Joan Albiol Sala y el Dr. Pau Ferrer Alegre, professors associats en el grup d'enginyeria de Biotecnologia i Biotecnologia Aplicada del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que l'enginyer químic Joel Jordà Murria ha dut a terme sota la nostra direcció, el treball que, amb el títol: **“Anàlisi quantitatiu de l'efecte de la expressió d'una lipasa recombinant sobre el metabolisme central de *Pichia pastoris*”** es presenta en aquesta memòria, la qual consisteix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que se'n prengui coneixement i consti als efectes oportuns, signem la present a Bellaterra Febrer de 2013.

Dr. Pau Ferrer Alegre

Dr. Joan Albiol Sala

**“Tu mayor competidor es lo que quieres llegar a ser.”
(Jim Taylor)**

Agraïments

Crec que ja arribat el moment que aquest camí arribi al seu final, a costat molt però ja està. Espero no oblidar-me a ningú així que des del principi, moltíssimes gràcies a tots els que han fet possible aquest treball.

En primer lloc, voldria agrair als meus pares tot l'esforç que han fet des de primer dia fins a dia d'avui on sempre han intentat que entengui que totes les coses amb esforç tenen el seu fruit, que confiï més amb mi mateix i que intenti ser més optimista, ja que de vida solament en hi ha una i es una llàstima perdre el temps sempre amb una visió negativa d'aquesta.

Pau, Joan moltes gràcies per l'oportunitat de poder realitzar aquest treball sota la vostra supervisió heu estat una valuosa font de coneixement durant tots aquets anys i espero utilitzar-la en la nova etapa que m'espera.

Ara toca el torn dels companys, grans amics que he fet durant tots aquests anys, Marina, Alfred, Llarguerut, qui varen començar aquest camí amb mi i a dia d'avui son grans professionals ens els seus respectius camps; gràcies per tots els bons moments que hem passat i per totes les coses que he après de vosaltres. Marc, gràcies per els bons moments i per tota l'ajuda prestada durant tot aquest temps.

Els companys de grup i no menys importants, Margot "Rubia", Núria, Xavi "drumer" i Xavi, Albert, Jose, Marius, Marcel.la, Dani, Martina, Anna i Elena "Furbi" hem passat molts moments divertits i he après moltes coses interessants de tots vosaltres. Desitjo de tot cor que algun dia no molt llunyà pugueu escriure aquets agraïments i recordar un noi de les terres de l'Ebre que parlava una mica estrany, gràcies per la vostra amistat i el recolzament durant tots aquets anys.

També m'agradaria donar les gràcies a un molt bon amic que crec que es mereix unes línies, Martiño espero que la nostra amistat duri molts anys i gràcies un altre cop per tots els bons consells que hem vares donar per no perdre el bon camí.

No m'oblidava dels meus companys de despatx, Javi, Edu, Rim, Juliana, Caterina i els que ja no hi son Michele, Tashin, Erasmo i Ana moltes gràcies per haver-me aguantat durant tots aquest anys, ja se que soc una mica puden i una mica negatiu però al final sempre tinc una bona rialla que ho arregla tot. Per cert, cuideu la cafetera que ja es patrimoni del despatx.

També m'agradaria agrair a tots els amics de les Terres que han fet que cada fi de setmana oblidi un mica les dificultats del treball i agafi força per tornar-ho a intentar un altre el seguïnt dilluns.

Bueno ara ja crec que et toca Vane, no tinc paraules per agrair tot el que has fet per mi durant tots aquest anys, sempre has estat al meu costat amb totes les coses que he començat i allí as estat quant aquestes s'han acabat, amb tu he rigut i amb tu he plorat. Dons bé, aquesta també s'ha acabat i aquí as estat tu. Gràcies per aguantar tots els enfadós, gràcies per animar-me sempre en tot moment fins i tot quant tu no estaves passant els millors temps, gràcies per esperar hores i hores a que analitzes totes les mostres dels diferents experiments, en fi gràcies per tot. Estic a punt de començar un nou camí i m'agradaria que també estiguessis amb mi.

Finalment, moltíssimes gràcies a tots aquells que directa o indirectament han contribuït a que aquest treball sigui possible.

Índex

Llistat d'abreviatures	11
Ressenya	13
Capítol 1. Introducció general	19
Biotecnologia	21
Sistemes d'expressió	21
Els llevats	21
Llevats metilotròfics	22
Pichia pastoris com a sistema d'expressió.....	22
Promotor de l'AOX en Pichia pastoris	23
Metabolisme del metanol en llevats metilotròfics.....	24
La lipasa de Rhizopus oryzae.....	25
Cultius operats en continu com a eina experimental per a l'anàlisi quantitativa del metabolisme	26
Anàlisi de Fluxos metabòlics (MFA)	27
Principi del MFA	27
Tècniques de marcatge isotòpic amb ¹³ C.....	29
Metodologies d'anàlisi de fluxos metabòlics basades en dades de ¹³ C.....	35
Anàlisi de fluxos metabòlics basat en determinació de relacions de fluxos en nodes locals	36
Anàlisi del model isotopomèric complet	36
Antecedents d'aquest treball	37
Objectius de la Tesi	38
Bibliografia	39
Capítol 2. Composició de Biomassa	43
Material i Mètodes	45
Soques.....	45
Condicions de cultiu.....	46
Anàlisi de Biomassa	47
Quantificació de la proteïna ROL.....	50
Concentracions del brou de cultiu	51
Resultats i Discussió	51
Composició Molecular de la biomassa	52
Contingut d'aminoàcids i proteïna total.....	53
Contingut de RNA i DNA total.....	56
Contingut de carbohidrats total.....	57
Contingut de Lípid total.....	58
Composició elemental de la biomassa	58
Anàlisi de consistència i reconciliació de dades	58
Balanç màssic dels components d'entrada i sortida	61
Conclusions	63
Apèndix	64
Bibliografia	66
Capítol 3. Distribució de fluxos en <i>P. pastoris</i>	69
mitjançant metodologia ¹³C	69

Introducció	71
Materials i mètodes	71
Soques.....	71
Condicions de cultiu.....	72
Procediments analítics	72
Marcatge Fraccional Biosintèticament Dirigit amb ¹³ C	73
Espectroscòpia NMR.....	73
Anàlisi basat en la relació entre fluxos metabòlics (METAFor).....	73
Equacions de distribució de fluxos.....	74
Anàlisi de la distribució de flux metabòlic amb metodologia ¹³ C.....	77
Càlcul de les taxes de regeneració del NADH.....	78
Resultats i discussió	79
Creixement i formació de productes	79
Impacte de la co-assimilació de metanol en el metabolisme central de <i>P. pastoris</i>	81
Impacte de la secreció de Rol en el metabolisme de carboni central de <i>P. pastoris</i>	84
Conclusions	87
Apèndix	89
Bibliografia	96
Capítol 4. Distribució de fluxos mitjançant ajust iteratiu en cultius amb glicerina/metanol	99
Introducció	101
Materials i mètodes	102
Soques i condicions de cultiu.....	102
Procediments analítics	102
Anàlisis de fluxos metabòlics mitjançant marcatge fraccional ¹³ C	102
Càlcul de les taxes de regeneració de NADH i requeriments energètics.....	105
Resultats i discussió	106
Creixement i producció de proteïna recombinant.....	106
Impacte de la relació glicerina/metanol en la distribució de fluxos metabòlics.....	112
Generació d'equivalents de reducció NADH i NADPH	116
Requeriments energètics.....	117
Conclusions	118
Apèndix	120
Bibliografia	129
Capítol 5. Metabolòmica i anàlisi de fluxos metabòlics basades en experiments dinàmics de marcatge isotòpic ¹³C	131
Introducció	133
Materials i mètodes	134
Soques i condicions de cultiu	134
Experiment de marcatge.....	135
Presa de mostra i mesura de les concentracions dels metabòlits	135
Anàlisi de fluxos metabòlic basat en dades de marcatge amb ¹³ C en condicions no estacionàries (INST- ¹³ C-MFA).....	135
Anàlisis termodinàmic de la xarxa metabòlica utilitzada.	137
Procediments analítics	137
Quantificació de metabòlits extracel·lulars	138
Resultats	138
Anàlisi dels cultius.....	138
Anàlisis metabolòmic	139
Temps d'intercanvi dels metabòlits principals del metabolisme de <i>P. pastoris</i>	143
Marcatge dinàmic amb ¹³ C i extinció de la xarxa metabòlica.....	144
Glucosa-6-fosfat (Glc6P)	144
Piruvat	148

Intermediaris del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA).....	148
Reaccions reversibles.....	149
Fluxos obtinguts mitjançant l'anàlisi de fluxos metabòlics en condicions de marcatge isotòpic no-estacionàries (INST) ¹³ C-MFA.....	150
Generació i consum de cofactors.....	153
Conclusions.....	155
Apèndix.....	156
Bibliografia.....	166
Capítol 6. Anàlisi multinivell (metabolomic i INST ¹³C-MFA) de l'impacte de la secreció de proteïna recombinant en <i>P. pastoris</i>.....	170
Introducció.....	172
Materials i mètodes.....	172
Soques i condicions de cultiu.....	172
Disseny experimental i anàlisi de fluxos metabòlics.....	173
Procediment analític.....	173
Resultats.....	174
Cultius en continu.....	174
Anàlisi comparativa de X-33 Rol_1 amb la soca de referència (X-33 control).....	175
Efecte de la producció de proteïna recombinant sobre el metabolisme dels aminoàcids.....	178
Anàlisi de fluxos metabòlics en condicions de marcatge isotòpic dinàmiques (INST- ¹³ C-MFA).....	179
Requeriments energètics i regeneració de co-factors.....	180
X-33 Rol_3.....	184
Conclusions.....	186
Apèndix.....	187
Capítol 7. Conclusions generals.....	205
Determinació de fluxos metabòlics utilitzant restriccions locals derivades d'anàlisi de dades ¹³C-NMR d'aminoàcids proteïcs.....	207
Determinació de fluxos metabòlics mitjançant ajust iteratiu global de dades de marcatge ¹³C-NMR d'aminoàcids proteïcs.....	208
Anàlisi metabolòmica quantitativa i anàlisi de fluxos metabòlics basat en dades de marcatge ¹³C en condicions dinàmiques de metabòlits i aminoàcids lliures.....	209
Treballs futurs.....	209
Bibliografia.....	210
Contribucions científiques.....	211

Llistat d'abreviatures

<i>αKG</i> : α-ketoglutarate;	<i>CGlu</i> : First carbon labelled Glucose;
<i>GA3P</i> : Glyceraldehyde-3-phosphate;	<i>Metoh</i> : Methanol;
<i>PG2</i> : 2-phosphoglycerate;	<i>MetohL</i> : labelled Methanol;
<i>PG3</i> : 3-phosphoglycerate;	<i>X_{bio}</i> : Biomass formation;
<i>GA3P_{per}</i> : Glyceraldehyde-3-phosphate peroxisome pool;	<i>NPyr</i> : Not labelled Pyruvate;
<i>DHA</i> : Dihydroxyacetone;	<i>Pyr_t</i> : total Pyruvate pool;
<i>DHAP</i> : Dihydroxyacetone phosphate;	<i>Form</i> : Formaldehyde;
<i>E4P</i> : Eritrose-4-phosphate;	<i>FOR</i> : Formate;
<i>Rib5P</i> : Ribose-5-phosphate;	<i>OAA</i> : Oxaloacetate
<i>Rul5P</i> : Ribulose-5-phosphate;	<i>ACALD</i> : Acetalehyde;
<i>Xul5P</i> : Xylulose-5-phosphate;	<i>PRPP</i> : Phosphoribosyl pirophosphate;
<i>Man6P</i> : Manose-6-phosphate;	<i>MTHF</i> : Metylenetetrahydrofolate;
<i>Fru6P</i> : Fructose-6-phosphate;	<i>THF</i> : Tetrahydrofolate;
<i>Glc6P</i> : Glucose-6-phosphate;	<i>CHOR</i> : Chorismate;
<i>Sed7P</i> : Sedoheptulose-7-phosphate;	<i>Pi</i> : Inorganic phosphate;
<i>FBP</i> : Fructose-1,6-biphosphate;	<i>PPi</i> : Inorganic pyrophosphate;
<i>T6P</i> : Trehalose-6-phosphate;	<i>13dpg</i> : 1,3 Diphophoglycerate;
<i>Treh</i> : Trehalose;	<i>G1P</i> : Glucose 1-phosphate;
<i>Pyr</i> : Pyruvate;	<i>Glyc3P</i> : Glycerol 3-phosphate;
Glc: Glucose;	<i>SUCCoA</i> : Succinyl coenzyme A;
<i>Pep</i> : Phosphoenolpyruvate;	<i>Kval</i> : Ketovalerate;
<i>MAL</i> : Malate;	<i>DHF</i> : Dihydropholate.;
<i>SUCC</i> : Succinate;	METAFor: Metabolic Flux Ratio
<i>CIT</i> : Citrate;	□: Specific growth rate;
<i>ICIT</i> : Isocitrate;	ppp: pentose phosphate pathway;
<i>FUM</i> : Fumarate;	TCA: Citric acid cycle;
<i>ACCoA</i> : Acetyl coenzyme;	P/O: Efficiency of ATP generation in the Oxidative phosphorylation;
<i>Glu_x</i> : Glucose intra/extra;	γ: degree of reduction of the biomass;
<i>FullyGlu</i> : Fully labelled Glucose;	RQ: Respiratory coeficient;
X-33: Control Strain;	
X-33 Rol_1: Expressing Strain with 1 gen copy	Other:
X-33 Rol_2: Expressing Strain with 2 gen copy	<i>n.d.</i> : not determined;
X-33 Rol_3: Expressing Strain with more than 2 gen copy	<i>sd</i> : standard deviation.

Ressenya

La determinació de fluxos metabòlics constitueix una eina fonamental per a l'anàlisi quantitativa de la fisiologia cel·lular, ja que ens proporciona una mesura del grau d'implicació de les diverses vies en els processos metabòlics així com una visió general del comportament cel·lular. La quantificació exacta de la magnitud dels fluxos de cadascuna de les diferents vies “*in vivo*” és, per tant, un objectiu important de la fisiologia cel·lular i l'enginyeria metabòlica, especialment en el context de la biotecnologia industrial, l'objectiu principal de la qual és maximitzar la producció del compost d'interès, com ara la producció de compostos químics, biopolímers o d'altres compostos bioactius com ara les proteïnes.

Aquest projecte de recerca s'ha dirigit a contribuir a una millor comprensió de la fisiologia del llevat metilotròfic *Pichia pastoris* sota l'estrès ocasionat per la producció de proteïnes recombinants. Concretament, aquesta tesi s'ha centrat en l'anàlisi sistemàtica del metabolisme cel·lular a nivell fluxomic i metabòlic, i com aquests conjunts de dades de diferents nivells poden integrar-se i contribuir a la comprensió dels efectes de la càrrega metabòlica potencialment imposada per la secreció d'una proteïna recombinant i l'efecte del tipus de font de carboni utilitzat.

En el **Capítol 2**, s'obtingué una descripció consistent de la composició principal de la biomassa de *P. pastoris* per a cada condició de cultiu realitzada en aquest estudi. Els resultats obtinguts han estat utilitzats en els capítols següents per realitzar l'anàlisi de fluxos metabòlics.

En el **Capítol 3**, es realitzaren experiments amb marcatge ^{13}C fraccional biosintèticament dirigit (BDF). Els experiments es realitzaren en cultius operats en continu de *P. pastoris* creixent amb barreges de glucosa/metanol com a font de carboni, per tal d'obtenir informació sobre les relacions entre fluxos de les principals vies metabòliques del metabolisme central d'aquest llevat. Es desenvoluparen noves equacions pel cas de la mescla de font de carboni mixta glucosa/metanol utilitzada. Seguidament, aquestes relacions foren utilitzades per dur a terme l'anàlisi de fluxos metabòlics de les diferents soques de *P. pastoris* secretores d'una lipasa recombinant (les quals tenien 1 i 2 còpies del gen que codifica la lipasa). La principal característica obtinguda, reflectida en els diferents quocients de fluxos metabòlics i les dades macroscòpiques dels cultius, fou la similitud en les estimacions finals de fluxos entre les dues soques productores de lipasa. No obstant, s'observaren diferències estadísticament significatives al comparar ambdues soques amb la soca control de referència (no productora).

Durant el **Capítol 4**, seguint la mateixa metodologia comentada en el capítol anterior, s'estudià l'efecte de la taxa de dilució i diferents relacions de barreges glicerina/metanol com a font de carboni en cultius en continu de *P. pastoris* amb una única còpia del gen de la lipasa. Concretament, es realitzaren cultius a dues velocitats de dilució per tal d'avaluar l'impacte combinat de la composició de les diferents mescles de fonts de carboni i velocitat de creixement sobre la distribució de fluxos intracel·lulars. Les dades experimentals obtingudes en aquest estudi es combinaren amb dades de marcatge ^{13}C obtingudes en experiments previs sota les mateixes condicions. No obstant, com a conseqüència de la utilització de glicerina en lloc de glucosa, no fou possible la utilització de les equacions de flux formulades en el capítol anterior. Per tant, com a solució alternativa, s'implementà una metodologia basada en l'avaluació global de la xarxa metabòlica per tal de calcular la distribució de fluxos. Curiosament, no s'observaren

diferències estadísticament significatives en la distribució de fluxos quan es compararen els diferents cultius amb diferent relació de glicerina/metanol realitzats sota la mateixa taxa de dilució. D'altra banda, si que s'observaren clares diferències en el moment de comparar els patrons de flux corresponents a diferents taxes de dilució.

Les diferents anàlisis metabolòmiques es descriuen en els Capítols 4 i 5. En el **Capítol 5**, s'aplicà una anàlisi metabolòmica juntament amb una distribució de fluxos en condicions isotopomèriques no estables (condicions de marcatge ^{13}C en dinàmic) per a caracteritzar el metabolisme central de carboni de la soca de referència (control) de *P. pastoris* creixement amb glucosa/metanol com a font de carboni mixta. Una nova metodologia basada en les dades de marcatge obtingudes mitjançant GC-MS i LC-MS ens va permetre una quantificació més precisa dels diferents fluxos metabòlics per a les vies de les pentoses fosfat, la glucòlisi i la via d'assimilació del metanol. Posant com a referència els resultats obtinguts en el capítol 3, aquesta nova metodologia permeté determinar una distribució de fluxos més ampla i acurada. Així mateix, es realitzà una anàlisi termodinàmica de les dades de metabolòmica, la qual ens va permetre validar les concentracions de metabòlits mesurades i les direccions dels fluxos calculades. Finalment, en el **Capítol 6**, es realitzà una comparació fluxòmica i metabolòmica entre les diferents soques utilitzades en aquesta tesi, a més a més d'una altra soca amb més de 2 còpies del gen de la lipasa disponible en el Grup de recerca. Els resultats obtinguts no mostraren diferències estadísticament significatives entre les diferents soques productores en termes de distribució global dels fluxos. Ara bé, s'observaren diferències locals estadísticament significatives en alguns punts de la xarxa metabòlica. A més, l'anàlisi metabolòmica, revelà diferències clares entre la soca control i la productora, com ara la concentració de trehalosa, metabòlit estretament lligat a respostes d'estrès.

En general, durant aquesta tesi s'ha portat a terme amb èxit la implementació de noves metodologies per a l'anàlisi dels fluxos metabòlics de *P. pastoris*. Aquestes metodologies han estat comparades i posteriorment validades. A més a més, utilitzant les diferents dades metabolòmiques obtingudes, ens ha permès expandir la xarxa metabòlica proposada durant els primers capítols d'aquesta tesi, ampliant així el coneixement sobre l'impacte de producció d'una proteïna recombinant sobre el metabolisme central del carboni de *P. pastoris* creixent sobre fonts de carboni mixtes..

Summary

Determination of metabolic fluxes constitutes a fundamental tool for quantitative analysis of cell physiology, as they provide a measure of the degree of engagement of various pathways in metabolic processes and overall cellular function. Accurate quantification of the magnitude of pathway fluxes *in vivo* is, therefore, an important goal of cell physiology and metabolic engineering, especially in the context of industrial biotechnology, where the aim is to convert as much substrate as possible into useful products such as chemicals, chemical building blocks, biopolymers or bioactive compounds such as proteins.

This research project was aimed to contribute to the better understanding of the *Pichia pastoris* physiology under recombinant protein production stress. Specifically, this thesis was focused on the systematic analysis of cell metabolism at the fluxome and metabolome omics levels, and how datasets from these different levels can be integrated and contribute to the understanding of the impact of the potential burden imposed by the secretion of a recombinant protein and the type of mixed carbon source used.

In **Chapter 2**, a consistent description of the biomass principal component of *P. pastoris* was obtained for each condition tested in this study, obtaining the best estimation of the biomass composition. The obtained results were afterwards used in the following chapters to perform the metabolic flux analysis.

In **Chapter 3**, biosynthetically directed fractional ^{13}C -labelling (BDF) experiments were performed in chemostat cultures of *P. pastoris* growing on a glucose/methanol mix, obtaining information about the principals metabolic flux ratios of the central carbon metabolism of this yeast. New equations were developed for the case of “glucose/methanol” as a mixed carbon source. Afterwards, these values were used to perform the metabolic flux analysis of two *P. pastoris* strains secreting different amounts of a recombinant lipase (corresponding to strains harbouring 1 and 2 copies of the lipase encoding gene). The most prominent feature obtained, already indicated by the metabolic flux ratios and the macroscopic data, was the similarity in flux estimations between the two lipase producing strains. Nevertheless, statistical differences were observed when comparing the control (non-producing) strain to the production strains.

In **Chapter 4**, using the same experimental approach as in chapter 3, chemostat cultures of the *P. pastoris* strain harbouring one copy of the lipase gene growing on 3 different “glycerol/methanol” and 2 dilution rates were performed to evaluate the impact of carbon mix compositions and growth rate on the flux distribution. Experimental data was combined with existing ^{13}C -labelling datasets obtained from previous BDF experiments performed on replica experiments. However, due to the use of glycerol instead of glucose, it was not possible to use the equations formulated in the previous chapter. Hence, an alternative approach based on the global evaluation of the metabolic network was done in order to calculate the final flux distribution. Interestingly, no statistical differences were observed when the experiments were done under a given dilution rate varying the glycerol-methanol concentrations. Nevertheless, clear differences were observed when comparing flux patterns corresponding to different dilutions rates.

The metabolome analyses were performed in Chapters 4 and 5. In **Chapter 5**, metabolomic and instationary ^{13}C flux analysis was applied to characterize the central carbon metabolism under “glucose/methanol” co-assimilating conditions, using the same reference control strain from

Summary

Chapter 3. A new methodology based on GC-MS and LC-MS derived data allowed for an accurate mapping of metabolic fluxes for the glycolytic, pentose phosphate and methanol assimilation pathways. Compared with the results obtained in Chapter 3, more fluxes could be determined. Furthermore, using thermodynamic metabolic network analysis of metabolome data allowed validating metabolite measurements and metabolic flux directions.

Finally in **Chapter 6**, a fluxome and metabolome comparison between the strains used in this thesis plus another strain harbouring five copies of the lipase gene was performed. The results showed no statistical differences between the tested strains in terms of global flux distribution, however we observe statistical differences in some fluxes of the metabolic network. Nevertheless, metabolome analysis, revealed some clear differences for example in the trehalose pool, as a result of the impact of protein secretion in the metabolite concentration pools.

Overall, during this thesis we have succeeded in establishing new methodologies for the analysis of *Pichia pastoris* flows. These methodologies have been compared and validated. Moreover using the metabolomics data obtained has allowed us to expand the metabolic network proposed in the early chapters increasing the knowledge about the impact of a recombinant protein production using different carbon sources as a mixed substrates.

Biotecnologia

Entenem per biotecnologia l'aplicació dels principis de la ciència i de l'enginyeria al processament de materials mitjançant agents biològics per tal d'obtenir béns i serveis. Tractant-se d'una ciència interdisciplinària, requereix de coneixements procedents de diferents àmbits de treball com ara la biologia, l'enginyeria, la química aplicada i requereix de complexes tècniques computacionals.

Els camps d'aplicació de la biotecnologia, cada cop més extensos, abasten sectors com ara el farmacèutic, químic, alimentari o el de l'agricultura, entre d'altres. Ara bé, una de les aplicacions més precisades és en la producció de petites quantitats de productes amb gran valor afegit. D'altra banda, l'augment del rendiment i la disminució de costos de producció és un aspecte rellevant en la biotecnologia quan observem grans produccions amb poc valor afegit[1]. Així doncs, podem incloure la producció de proteïnes heteròlogues, com productes de gran valor afegit, punt de partida per la producció de productes farmacèutics o d'enzims industrials [2]. Tot i que s'han produït quantitats importants de proteïnes actives mitjançant diferents sistemes biològics [3], encara hi ha limitacions per a la seva producció a escala industrial.

El camp de l'enginyeria metabòlica té com a principal objectiu la manipulació racional del metabolisme cel·lular mitjançant diferents tècniques, amb la finalitat de produir el compost final desitjat o contràriament, eliminar o reduir els compostos que no son d'interès. Per poder aconseguir aquest objectiu, es precisa d'un coneixement extens del metabolisme cel·lular de l'organisme en qüestió [4].

Sistemes d'expressió

Els sistemes d'expressió per a proteïnes recombinants estan basats en organismes procariotes i eucariotes, cadascun d'ells amb les seves particularitats que els caracteritzen. Per tal d'escollir el sistema d'expressió més adequat cal avaluar diferents aspectes que van des de la productivitat del sistema, les característiques físico-químiques i la bioactivitat de la proteïna fins a aspectes econòmics de producció o de seguretat del sistema [5].

Els llevats

Els llevats són sistemes d'expressió eucariòtics, classificats dins el regne dels fongs unicel·lulars amb la capacitat de metabolitzar sucres amb condicions de disponibilitat d'oxigen reduïda . Com a sistema d'expressió comparteixen amb els sistemes procariotes la simplicitat de cultiu i velocitats relativament altes de creixement amb costos de producció reduïts, característiques que permeten un sistema on les proteïnes sintetitzades siguin secretades al medi. D'altra banda, en ser organismes eucariòtics, tenen la possibilitat de produir proteïnes amb modificacions post-traduccionals pròpies d'aquest tipus d'organismes necessàries per a la seva funcionalitat.

Llevats metilotròfics

Pichia pastoris és un llevat metilotròfic facultatiu que pertany al grup dels ascomicets, els quals es reproduïxen per gemmació homotàlica tenen una dotació genòmica que roman haploide. [3]. Aquests llevats comparteixen una ruta específica d'assimilació de metanol Figura 1. Les reaccions inicials tenen lloc en orgànuls especialitzats, els peroxisomes, seguit per diferents etapes posteriors en el citoplasma. L'adaptació al creixement sobre metanol implica la inducció de les activitats d'un determinat nombre d'enzims clau, com és el cas de l'alcohol oxidasa, la catalasa, la formaldehid deshidrogenasa i la dihidroxiacetona sintasa, així com la biosíntesi de peroxisomes [6]. D'altra banda, la inducció de la producció d'aquests enzims està fortament reprimida en el moment en què s'utilitzen substrats multicarbonats com la glucosa o la glicerina. Ara bé, també pot tenir lloc una coassimilació simultània d'una font de carboni múltiple i metanol sota determinades condicions de creixement[7][8][9].

Pichia pastoris com a sistema d'expressió

El sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues en *P. pastoris* està principalment basat en l'ús del promotor de l'enzim alcohol oxidasa (P_{AOXI}), que està fortament regulat i induït per metanol, fent-lo molt atractiu per a la seva aplicació en la producció de proteïnes recombinant.

P. pastoris és un llevat metilotròfic que presenta diversos avantatges respecte altres llevats com a sistema d'expressió. La glicosilació representa una important modificació per a les proteïnes expressades, amb un impacte potencial sobre la seva estabilitat, activitat o immunitat. *P. pastoris* té menys tendència a la hiperglicosilació de proteïnes que *S. cerevisiae*. Altres característiques que fan de *P. pastoris* un sistema d'expressió interessant són: la possibilitat d'aconseguir quantitats de proteïnes en el rang de mil·ligrams a grams, la capacitat de créixer eficientment en un medi mínim barat, la rapidesa amb què els cultius poden ser escalats per satisfer demandes més grans i la possibilitat de controlar paràmetres que influeixen en la productivitat del sistema com ara el pH, l'aeració i l'addició de substrat.

Referent a les tècniques de manipulació genètica per a *P. pastoris*, aquestes són relativament senzilles i similars a les desenvolupades per a *Sacharomyces cerevisiae*. A més, el fet de ser un organisme haploide representa un avantatge, ja que qualsevol mutació genètica es manifesta fenotípicament.

D'altra banda, el fet que presenta un nivells de secreció de proteïnes natives, facilita la purificació de les proteïnes recombinants secretades.

En la Taula 1 es mostra una classificació de diferents sistemes d'expressió amb els pros i els contres de la seva utilització.

Sistema d'expressió	Avantatges	Inconvenients
Bacteris	I. Sistema d'expressió ràpid II. Medi de producció assequible III. Altes densitats cel·lulars IV. Fàcil procés d'escalat	I. Producció de proteïnes tòxiques II. No realitzen modificacions postraduccionals
Llevats i fongs	I. Sistema d'expressió moderadament ràpid II. Altes densitats cel·lulars III. Medi de producció simple IV. Fàcil procés d'escalat	I. Degradació de proteïnes al medi per la presència de proteases. II. Creixement més lent que les bacteries.
Cèl·lules d'insecte	I. Rendiments elevats II. Plegaments correctes de proteïnes III. Modificacions postraduccionals	I. Condicions de cultiu específiques
Cèl·lules animals	I. Alta producció de proteïnes	I. Elevat cost del medi de cultiu II. Sistema de cultiu molt complex III. Creixement molt lent

Taula 1. Resum general de diferents sistemes d'expressió. [10]

Promotor de l'AOX en *Pichia pastoris*

L'enzim alcohol oxidasa és el responsable de la primera de les reaccions d'oxidació del metanol en *Pichia pastoris*, i la seva síntesi està principalment regulada a nivell transcripcional pel promotor usat per excel·lència en l'expressió de proteïnes heteròlogues en aquest microorganisme, el P_{AOX1} . D'altra banda existeix un altre gen responsable de la síntesi de l'enzim en qüestió, el gen de l'alcohol oxidasa 2 (P_{AOX2})[11].

La presència d'aquests dos gens possibilita l'existència de tres fenotips diferents en quant a la seva capacitat de degradació de metanol: el fenotip salvatge o Mut^+ amb la presència de tots dos gens *AOX*, el fenotip Mut^s (on s'hi ha deleccionat el gen *AOX1*) i la Mut^- (on no hi és present cap dels dos gens *AOX*). Els nivells de transcripció de l'*AOX1* son molt més elevats que els de l'*AOX2*. Per aquest motiu, s'utilitza el P_{AOX1} per a l'expressió de proteïnes recombinants

Tanmateix, existeixen promotors alternatius per a la producció de proteïnes heteròlogues en *P. pastoris* Per exemple, el promotor constituït de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}), el promotor de la formaldehid deshidrogenasa (P_{FLD}), regulat per la font de nitrogen o també el promotor de la isocitrat liasa (P_{ICL1}), induïble per etanol, [12] i més recentment diferents promotors els quals no dependents de l'ús de metanol com a inductor per la síntesis, el P_{MET3} , el P_{SER1} , el P_{IS1} , el P_{THR1} i el P_{THI11} [13]

Aquesta tesi ha estat centrada en l'ús del sistema clàssic, és a dir soques de fenotip Mut^+ que expressen el gen *ROL* sota el control del promotor *AOX1* [14][15].

Metabolisme del metanol en llevats metilotròfics

L'oxidació completa del metanol a CO_2 i H_2O en microorganismes metilotròfics engloba tant vies dissimilatòries, les quals generen energia, com vies assimilatòries, les quals permeten tant l'obtenció d'energia a través del cicle dels àcids tricarbòxílics com la biosíntesi de material cel·lular. No obstant això, aquest metabolisme, en els llevats metilotròfics difereix respecte al dels bacteris metilotròfics en els següents aspectes:

- La naturalesa dels enzims involucrats: Per realitzar el primer pas d'oxidació del metanol, els llevats no posseeixen metanol deshidrogenases sinó alcohol oxidases.
- La compartimentalització de les reaccions durant el procés: En el cas dels llevats, part de l'oxidació del metanol té lloc dins d'òrgànuls cel·lulars denominats peroxisomes. Aquests compartiments membranosos contenen alguns dels enzims i metabòlits involucrats en el procés d'oxidació del metanol com per exemple l'alcohol oxidasa i la catalasa. Els peroxisomes poden arribar a ocupar el 90% del volum cel·lular quan les cèl·lules creixen en presència de metanol com a única font de carboni [16].
- La via de generació d'energia: En els bacteris metilotròfics l'oxidació del metanol està acoblada a la cadena de transport d'electrons. Tanmateix, en els llevats metilotròfics es genera poder reductor en forma de NADH en reaccions posteriors a la primera reacció d'oxidació del metanol a formaldehid.

En la Figura 1 es mostren les principals reaccions involucrades en el procés de metabolització del metanol en llevats metilotròfics, així com la compartimentalització del conjunt del procés a l'interior de la cèl·lula.

Pel que fa al metabolisme energètic, en els llevats metilotròfics, la via energètica d'oxidació del metanol a CO_2 i H_2O es defineix bàsicament en dues etapes:

- La primera etapa consisteix en l'oxidació de metanol a formaldehid. Aquesta reacció, la qual és essencial per a l'assimilació del metanol, té lloc íntegrament a l'interior del peroxisoma però d'ella no es desprèn energia útil per a la cèl·lula.
- Una segona fase, on part del formaldehid generat abandona el peroxisoma i s'oxida fins a CO_2 en el citosol. Els enzims que catalitzen aquesta segona fase són dependents del NAD^+ i de la seva activitat es desprèn poder reductor en forma de NADH. Els llevats metilotròfics obtenen energia per a la seva activitat cel·lular mitjançant l'oxidació d'aquest poder reductor (NADH) generat en el citosol.
- Finalment, part del formaldehid que no es oxidat cap a la formació de CO_2 es assimilat cap a l'interior del metabolisme central de carboni amb la condensació d'aquets amb una molècula de xilulosa-5-monofosfat al peroxisoma catalitzada per la DHAS. Els productes d'aquesta condensació: el gliceraldehid-3-fosfat i la dihidroxiacetona abandonen el peroxisoma i entren a la via citoplasmàtica de regeneració de la xilulosa-5-monofosfat. Per cada tres cicles es genera una molècula neta de gliceraldehid-3-fosfat.

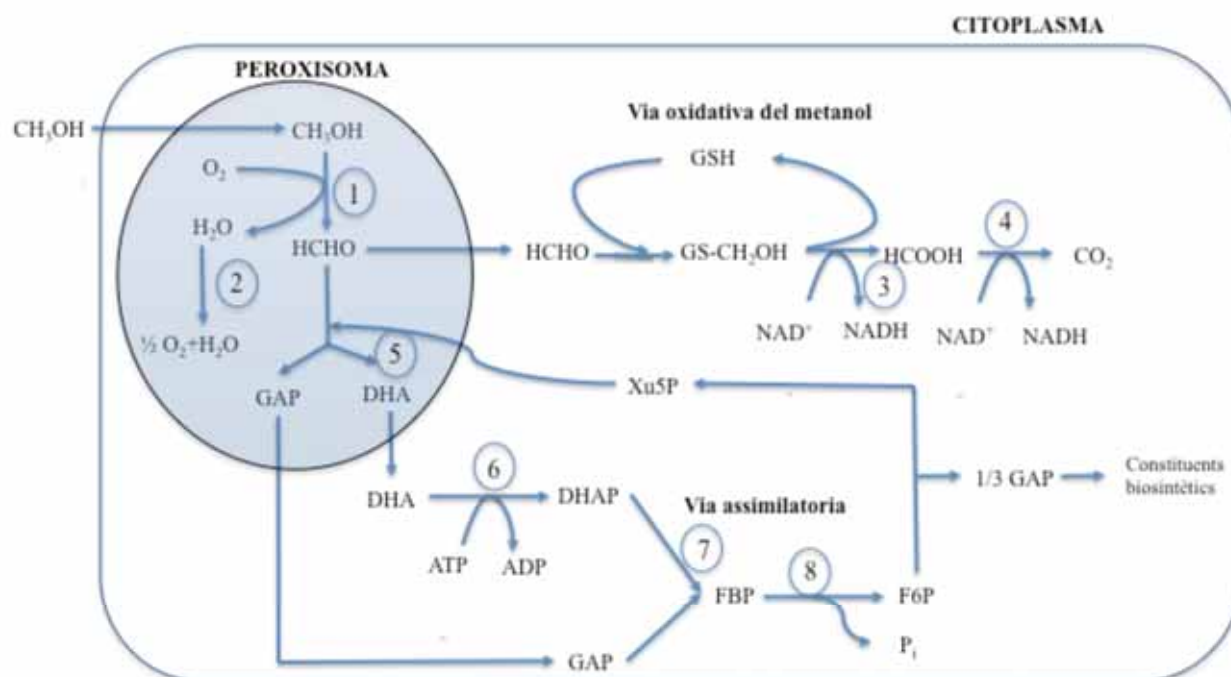


Figura 1. Representació esquemàtica del metabolisme del metanol en llevats metilotròfics. Enzims del peroxisoma: 1, AOX; 2, Catalasa; 5, DHAS. Enzims del citoplasma: 3, formaldehid deshidrogenasa; 4, format deshidrogenasa; 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfat aldolasa; 8, fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

La lipasa de *Rhizopus oryzae*

Les lipases són enzims que catalitzen la hidròlisi de triglicèrids per donar àcids grassos lliures (nomo i diglicèrids) i glicerina. Aquesta reacció és d'equilibri, de forma que la lipasa pot catalitzar també la síntesi de forma inversa. L'equilibri entre una reacció i l'altra està controlat pel contingut d'aigua en el medi de reacció de forma que, en condicions no aquoses, la lipasa catalitza la reacció de síntesi d'èsters.

En aquest treball, s'ha utilitzat el gen codificador d'una lipasa del fong *Rhizopus oryzae* (*ROL*) com a gen per ser expressat heteròlogament en *P. pastoris*. A part de la facilitat de seguiment dels seus nivells d'expressió amb un senzill assaig d'activitat lipolítica (Capítol 2, Assaig activitat lipolítica), el qual permet seguir els nivells de transcripció a partir del promotor de l'alcohol oxidasa (*AOX1*), és una proteïna model d'interès ja que la secreció de la seva forma madura en *P. pastoris* provoca una forta resposta d'estrès cel·lular en aquest organisme (Resina et al 2007). D'altra banda, és un enzim que presenta nombroses aplicacions d'interès industrial en el camp de la química fina.

El fong *Rhizopus oryzae* (Figura 2) és un organisme amb capacitat lipolítica, que originalment s'aïllà del fruit de la palma. De cultius d'aquest fong se n'ha aïllat una lipasa extracel·lular coneguda amb el nom de Rol (*Rhizopus oryzae* Lipase) [17]. La Rol nativa és una proteïna de 392 aminoàcids dividits en uns 26 primers aminoàcids que conformen la seqüència senyal,

seguits d'una pro-regió de 97 aminoàcids, i finalment els 269 aminoàcids que contenen la seqüència de la proteïna madura[18].



Figura 2. Fong *Rhizopus oryzae*

Les lipases són àmpliament utilitzades a la indústria, especialment en el sector farmacèutic [19]. També es poden utilitzar per realitzar resolucions de les mesclures racèmiques, degut a la seva alta selectivitat i especificitat [20]. Altres aplicacions de les lipases es troben en la producció de biosulfatants pels aliments, producció de biodièsel, o síntesi d'antitumorals, entre un gran nombre d'altres aplicacions. [21][22].

Cultius operats en continu com a eina experimental per a l'anàlisi quantitativa del metabolisme

Per a l'estudi de sistemes biològics, es precisa d'unes condicions de cultiu molt ben controlades, ja que és vital per una bona caracterització de l'estat fisiològic de la cèl·lula en qüestió. Per aquesta raó, els cultius en bioreactor operats en continu sovint s'utilitzen per a tal finalitat [23] [24], i fou escollit com a millor estratègia de cultiu degut a la facilitat d'estudi de les respostes cel·lulars a particulars pertorbacions com ara l'aeració, la temperatura, o el pH, entre d'altres, mantenint la resta de paràmetres constants. D'altra banda aquests sistemes de cultiu sovint també son escollits per a l'estudi de pertorbacions puntuals, com ara augments sobtats de l'entrada d'aliment (polsos) o canvis de gradients d'aquest.

Els cultius en continu, de la mateixa forma que ens permeten un bon control de les condicions predeterminades, ens faciliten l'estudi del nostre sistema amb una visió global de "caixa negra", a causa de la completa caracterització que ofereix un sistema en estat estacionari (Figura 4). Durant el transcurs d'aquesta tesi, el model de caixa negra ha estat aplicat utilitzant el balanç elemental de components com a restricció per tots els experiments en continu. L'aplicació d'aquest model ens permet estudiar un sistema sobredeterminat on es poden aplicar tests de consistència estadística [25] amb un 95% de confiança com a prova que no existeixen errors estadísticament representatius en les mesures.

Així doncs, aquest estricte control dels cultius ofereix una gran repetibilitat d'aquests amb petites variacions en mesures.

Biomassa
Producte

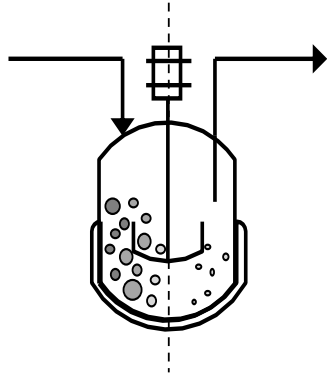


Figura 3. Model de caixa negra aplicat al sistema experimental

Anàlisi de Fluxos metabòlics (MFA)

Principi del MFA

Com a base d'investigació del metabolisme central de microorganismes s'utilitza l'eina denominada anàlisi de fluxos metabòlics (MFA), també coneguda com a balanç de metabòlits. Aquesta metodologia és freqüentment aplicada al camp de l'enginyeria metabòlica, la qual té com a finalitat la quantificació dels fluxos intracel·lulars en un sistema en estat estacionari amb un model metabòlic prèviament definit. Amb la informació obtinguda, hom pot obtenir un ampli coneixement del comportament intern del sistema d'estudi i intentar predir la conducta fenotípica dels microorganismes sota les condicions d'operació establertes, com a resultat d'alteracions genètiques o possibles efectes de diferents condicions ambientals. Un cop establert el model estequiomètric, es poden realitzar possibles prediccions del comportament cel·lular mitjançant la distribució del carboni intracel·lular, utilitzant aquesta metodologia com una eina important per a la enginyeria metabòlica.

Marc matemàtic

L'anàlisi de MFA està basada en el principi de conservació de masses dels metabòlits intracel·lulars utilitzant una ret estequiomètrica definida. Mesurant la relació de conversió neta dels metabòlits extracel·lulars, i assumint sempre un estat estacionari per la concentració de metabòlits intracel·lulars sense tenir en compte els efectes de dilució del creixement, el balanç de massa pot ser escrit de la forma següent:

$$\left(\frac{S}{R}\right) \cdot v = \left(\frac{0}{r_m}\right) \quad \text{Eq.1}$$

En l'equació 1 S és la matriu $N \cdot V$, on N és el nombre de metabòlits intracel·lulars i V és el nombre total de fluxos representats en el vector de fluxos (v). R és la matriu de mesures $M \cdot V$, on M és el nombre de fluxos nets mesurats representats en el vector r_m . La matriu R conté una única entrada per a cada mesura de fluxos nets.

En el cas on el rang de $\begin{pmatrix} S \\ R \end{pmatrix}$ és igual al nombre de fluxos (V), el sistema d'equacions és determinat i la totalitat dels fluxos poden ser calculats realitzant la inversió de la matriu. En certs casos, el sistema d'equacions és indeterminat ($\text{rang} \begin{pmatrix} S \\ R \end{pmatrix} < V$), llavors solament les combinacions lineals dels fluxos poden ser resoltes de la forma següent:

$$V = \text{pinv} \begin{pmatrix} S \\ R \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 0 \\ r_m \end{pmatrix} + \text{null} \begin{pmatrix} S \\ R \end{pmatrix} \cdot \beta \quad \text{Eq. 2}$$

L'Eq. 2 “pinv” reflecteix la pseudo-inversa de la matriu i “null” representa l'espai nul d'aquesta. El vector β conté els coeficients de les columnes de la matriu d'espai nul les quals representen els graus de llibertat que romanen després de la combinació dels balanços amb els fluxos extracel·lulars mesurats.

La Figura 5 mostra l'aplicació de MFA per a resoldre possibles distribucions de fluxos en 4 rets metabòliques simplifiades. Fluxos a través de nodes lineals o divergents poden ser fàcilment calculats, tal i com es mostra en la figura 5 A. D'altra banda un punt dèbil d'aquesta metodologia és la identificació de vies metabòliques paral·leles, reaccions reversibles o cicles metabòlics com en el cas de la Figura 5 (B C). Per aquestes dos últimes situacions de possibles vies metabòliques, el conjunt d'equacions lineals és indeterminable i solament un subconjunt de fluxos pot ser calculat. La matriu columna que apareix en cadascun d'aquests exemples reflecteix el grau de llibertat d'aquests sistemes, fet que ens indica que una mesura addicional és necessària per la seva resolució.

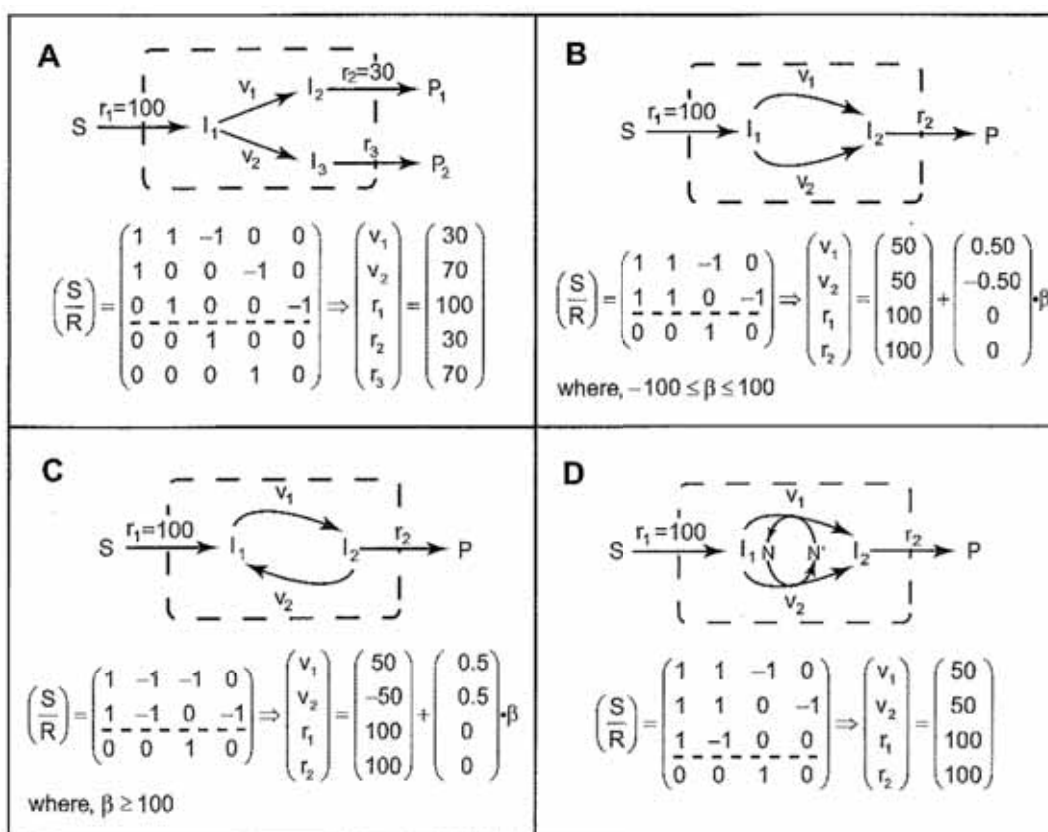


Figura 4. Aplicació de la metodologia de MFA per la resolució de distribucions de fluxos en diferents vies metabòliques. (A) vies divergents (B) vies paral·leles. (C) vies reversibles o cicles metabòlics. (D) vies paral·leles amb fraccions conservades. Les vies metabòliques A i D produeixen sistemes determinats d'equacions amb el consegüent d'una única possibilitat de càlcul. D'altra banda les vies metabòliques B i C són sistemes indeterminats. Així doncs, algun dels fluxos pot ser calculat mentre que d'altres han de ser expressats com a combinació lineal de la norma mínima i de l'espai nul [26].

Tècniques de marcatge isotòpic amb ^{13}C

Una alternativa metodològica per resoldre fluxos a través de vies paral·leles, reaccions bidireccionals i cicles metabòlics és complementar l'anàlisi de MFA amb experiments de carboni marcat ^{13}C . Els experiments amb carboni marcat es basen en el principi de substituir l'aliment subministrat al sistema per un de completament igual però amb la peculiaritat que els àtoms de carboni són ^{13}C . Aquest carboni marcat es distribueix a través de la xarxa metabòlica d'estudi, originant diferents graus d'enriquiment en ^{13}C en els metabòlits intracel·lulars. Basant-se en les diverses posicions on es localitzen els àtoms ^{13}C com a conseqüència de les diferents reaccions metabòliques, aquesta metodologia permet discernir i quantificar el flux a través de les diferents rutes metabòliques, inclús si aquestes tenen la mateixa estequiometria general. A la Figura 6 es mostra un petit exemple d'aquesta tècnica, on el producte final pot ser sintetitzat mitjançant dues vies paral·leles. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el balanç d'equacions plantejat forma un sistema indeterminat, el qual no ens dona una única possible solució. La distribució de fluxos a través d'aquestes vies paral·leles pot ser resolt alimentant una mescla de substrat no marcat i d'uniformement marcat en tots els seus carbonis [$U\text{-}^{13}\text{C}$], i mesurant el patró de marcatge del producte resultant. El producte format mitjançant la ruta v_1 - v_2 tindrà el mateix patró de

marcatge que el substrat subministrat. D'altra banda el producte format per la ruta v3-v4 reflecteix quatre patrons de marcatge diferents. La relació entre el producte totalment marcat i el parcialment marcat es pot extreure directament de la distribució de fluxos entre les dues vies paral·leles.

Cal remarcar que en aquest cas concret, el subministrament d'una font de carboni marcada únicament en la posició C1 [$1-^{13}\text{C}$] no ens resolndria la distribució de fluxos a través de les dues vies ja que les dues vies de formació de producte originarien la mateixa distribució de marca final. Així doncs, és molt important la realització d'un primer pas d'estudi on s'ha d'analitzar què és el que volem mesurar [27] i quina és la millor opció de marcatge [28].

El major avantatge de realitzar experiments amb substrat ^{13}C és la riquesa d'informació que s'extreu un cop analitzades les mostres. El nombre total de possibles combinacions ^{12}C i ^{13}C en una molècula, la qual conté n àtoms de carboni es 2^n . Així doncs, la informació extreta depèn de cada metabòlit en qüestió. Durant el transcurs d'aquesta tesi ens referirem a aquestes combinacions com isotopomers.

D'igual forma que amb el balanç màssic, podem formular un balanç d'isotopomers el qual ens aporta restriccions addicionals que poden ser imposades pel càlcul de fluxos.

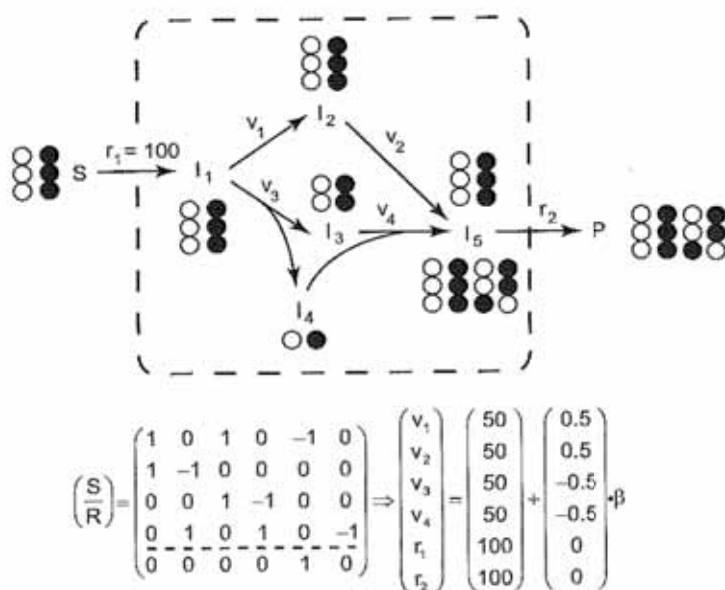


Figura 5 . Utilització de les tècniques de marcatge ^{13}C per a la resolució de vies paral·leles. Cercles oberts representen àtoms ^{12}C mentre que els cercles negres representen àtoms ^{13}C . Alimentant el sistema amb un substrat mescla de no marcat i uniformement marcat ^{13}C i mesurant els patrons de marcatge del producte P, la distribució de fluxos entre les dues vies paral·leles pot ser avaluada. [26]

Marc experimental

Les tres principals metodologies per la quantificació d'enriquiments isotòpics de metabòlits intracel·lulars són 2D [^{13}C , ^1H] COSY NMR [29], GC-MS [30] i LC-MS [31]. En la Taula 2, és mostren un resum dels avantatges i els desavantatges d'utilitzar cadascuna d'aquestes metodologies.

2D [^{13}C , ^1H] COSY NMR

La mesura de les diferents ressonàncies magnètica nuclear 'NMR' de distribucions ^{13}C està basada en la divisió dels senyals ^1H -NMR de protons, els quals estan enllaçats amb àtoms ^{13}C o de la divisió de senyals ^{13}C -NMR de carbonis ^{13}C enllaçats amb àtoms ^{13}C . La detecció de abundàncies relatives "valors- f " representa la interacció mitjançant un àtom de carboni ^{13}C i els seus successius veïns en una mateixa molècula. Depenent del nombre d'acoblements ^{13}C - ^{13}C romanents en el fragment analitzat, les abundàncies relatives "valors- f " representades en la Figura 8 poden ser detectades.

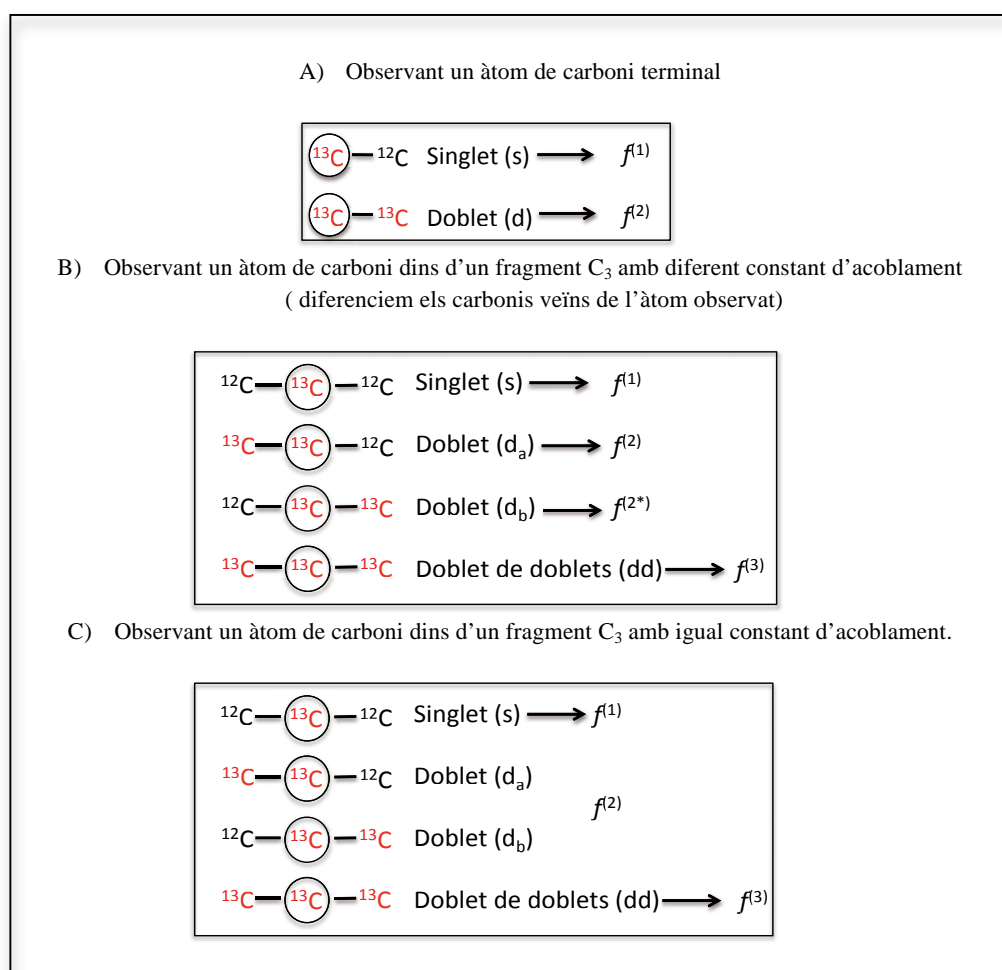


Figura 6. Nomenclatura de les intensitats relatives de cadascuna de les possibilitats que es poden contemplar en les diferents molècules d'aminoàcids proteics.

Tenint en compte la reduïda sensibilitat de la metodologia NMR, el marcatge dels metabòlits intracel·lulars ha de ser avaluat mitjançant l'acumulació de biomassa i la seva posterior anàlisi mitjançant els aminoàcids proteics i els carbohidrats de reserva. Així doncs, coneixent les vies metabòliques de síntesi d'aminoàcids podem extreure el patró de marcatge de la majoria de metabòlits primaris Figura 7. S'ha de remarcar que com que els metabòlits precursors de biomassa estan localitzats en compartiments predefinitos, llavors el valor d'enriquiment isotòpic mesurat és específic de cada lloc.

Com ja és conegut, els temps d'intercanvi en els constituents de la biomassa són llargs, de l'ordre d'hores, fet que obliga a l'alimentació de substrat marcat durant períodes llargs fins arribar a un patró de marcatge ^{13}C estable i poder realitzar la mesura. El reemplaçament de carboni ^{12}C per ^{13}C té lloc pràcticament amb la formació de nova biomassa i el rentat d'aquella ja present en el reactor. Així doncs, significa que en operacions amb discontinu i discontinu alimentat s'ha d'alimentar totalment substrat ^{13}C des de l'inici, mentre que amb operacions en continu són necessaris tres temps de residència per reemplaçar el 95% de la biomassa original, calculat amb una cinètica de rentat de primer ordre.

Degut al lent temps renovació de la biomassa, no són necessàries tècniques ràpides de presa de mostra i el tractament d'aquesta sols requereix d'un pas de filtració, liofilització i hidròlisi àcida amb HCl (metodologia àmpliament descrita en el Capítol 2).

Metodologia d'anàlisi	Què es mesura?	Avantatges	Desavantatges
LC-MS	Isotopomers màssics de metabòlits intracel·lulars	I. Sensible II. Informació directa de marcatge ^{13}C III. Ràpid estat estacionari isotòpic.	I. Cal presa de mostra ràpida i parada del metabolisme II. Informació de patrons de marcatge cel·lular promig
GC-MS	Isotopomers màssics d'aminoàcids proteics intactes i metabòlits intracel·lulars	I. Sensible II. Informació directa de marcatge ^{13}C III. Ràpid estat estacionari isotòpic.	I. Derivatització de les mostres prèvies als anàlisis II. Cal presa de mostra ràpida
NMR	Estructures fines d'aminoàcids proteics	I. Anàlisi no destructiu II. Informació específica sobre compartimentalització subcel·lular de patrons ^{13}C III. Fàcil presa de mostra IV. No són necessàries tècniques de separació	I. Menys sensibilitat II. Informació indirecta de metabòlits marcats amb ^{13}C III. Estat estacionari isotòpic lent.

Taula 2. Avantatges i desavantatges de les tres metodologies d'anàlisi més freqüents utilitzades per la mesura de distribucions ^{13}C . [26]

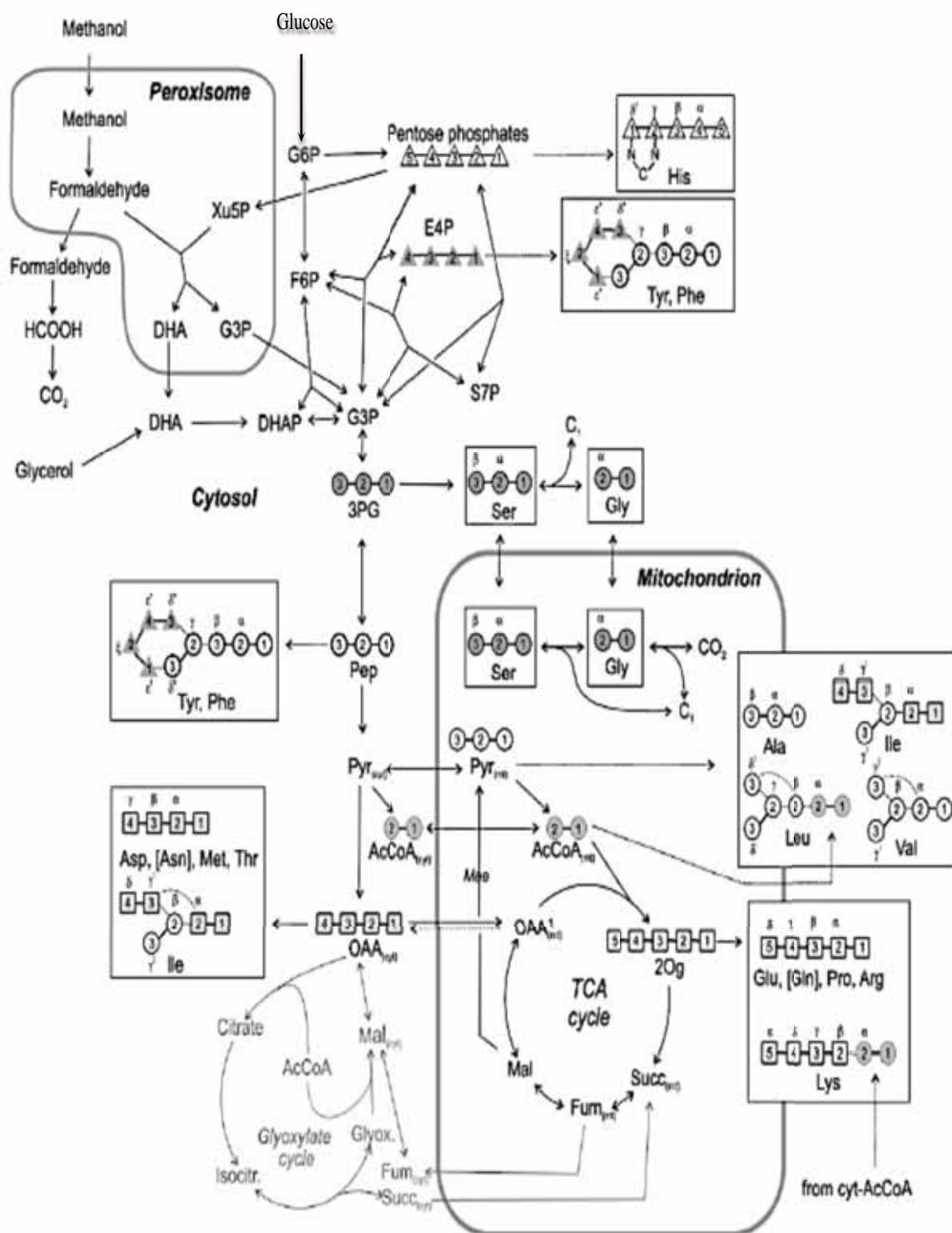


Figura 7. Xarxa metabòlica formulada per a *P. pastoris*. En la figura es mostren totes les possibles entrades de carboni utilitzades durant aquest treball, glucosa, glicerol i metanol. Tant els aminoàcids com els fragments originaris d'un únic intermediari del metabolisme central es representen a l'interior de requadres. Les línies fines entre els carbonis dels aminoàcids proteics representen unions de carbonis procedents de molècules diferents, mentre que les línies més gruixudes indiquen unions intactes de carbonis provinents de la mateixa molècula. L'esquelet carbonat de la via de la glucòlisi, pentoses fosfat (PPP) i el cicle dels àcids tiocarboxílics (TCA cycle) es representa mitjançant cercles, triangles i quadrats, respectivament. El nombre de cada àtom de carboni en els aminoàcids correspon a la posició de carboni en el seu metabòlit precursor. [9]

LC-MS

Actualment, s'estan utilitzant noves tècniques per a la determinació directa de patrons de marcatge ^{13}C de metabòlits primaris, com és el cas de LC-MS i GC-MS [32]. La metodologia LC-MS consta de dues etapes principals. Un primer pas de cromatogràfica líquida (LC) i un segon pas de identificació massica (MS). A diferència de la metodologia de NMR, permet quantificar directament metabòlits primaris.

Els temps de renovació per als metabòlits primaris de les vies principals (glucòlisi i pentoses fosfat) són de l'ordre de segons, fet que provoca temps curts d'alimentació amb substrat ^{13}C amb el conseqüent descens considerable del cost de l'experiment. Tenint en compte aquest temps d'intercanvi, cal un sistema ràpid de presa de mostra i parada del metabolisme cel·lular que permeti una correcta determinació dels patrons de marcatge ^{13}C .

El protocol per a la realització d'un mostreig adequat depèn bàsicament del sistema d'estudi escollit, on cal tenir en compte el microorganisme utilitzat i què és el que volem mesurar [33] [34]. El fet que en microorganismes compartimentalitzats alguns dels metabòlits es localitzen en diferents orgànuls, com el cas del piruvat, aquestes metodologies encara avui en dia no poden discernir els patrons de marcatge corresponents a cadascuna de les subpoblacions d'un determinat metabòlit, ja que en el pas d'extracció la cèl·lula es lisa totalment. Així doncs, per aquests casos concrets, el patró de marcatge quantificat és el patró-mig del total de molècules del metabòlit en qüestió presents a la cèl·lula.

GC-MS

La metodologia GC-MS consisteix bàsicament en dues etapes, d'igual forma que la tècnica l'esmentada anteriorment. En la primera fase, la mostra és injectada, escalfada i separada en components individuals, via cromatografia de gasos (GC); en la segona, cada component és identificat d'acord amb la seva massa (MS). Aquesta metodologia és utilitzada en experiments de marcatge on es descriu el nombre de carbonis ^{13}C en la molècula, però no la seva posició. Un avantatge d'aquest sistema d'anàlisi, com també passa amb LC-MS, és que totes les molècules analitzades poden ser fragmentades obtenint així informació posicional extra dels patrons de marcatge. El mostreig i la posterior preparació per l'anàlisi és similar a la tècnica NMR, amb un pas addicional de derivatització per fer possible l'evaporació de la mostra [35][32].

Comparant ambdues tècniques d'espectrometria de masses amb la NMR, la metodologia GC-MS/LC-MS és molt més sensible i requereix menys biomassa per fer l'anàlisi. Actualment aquestes metodologies són àmpliament aplicades de la mateixa forma, utilitzant l'una o l'altra dependent del protocol de quantificació final de què es disposa.

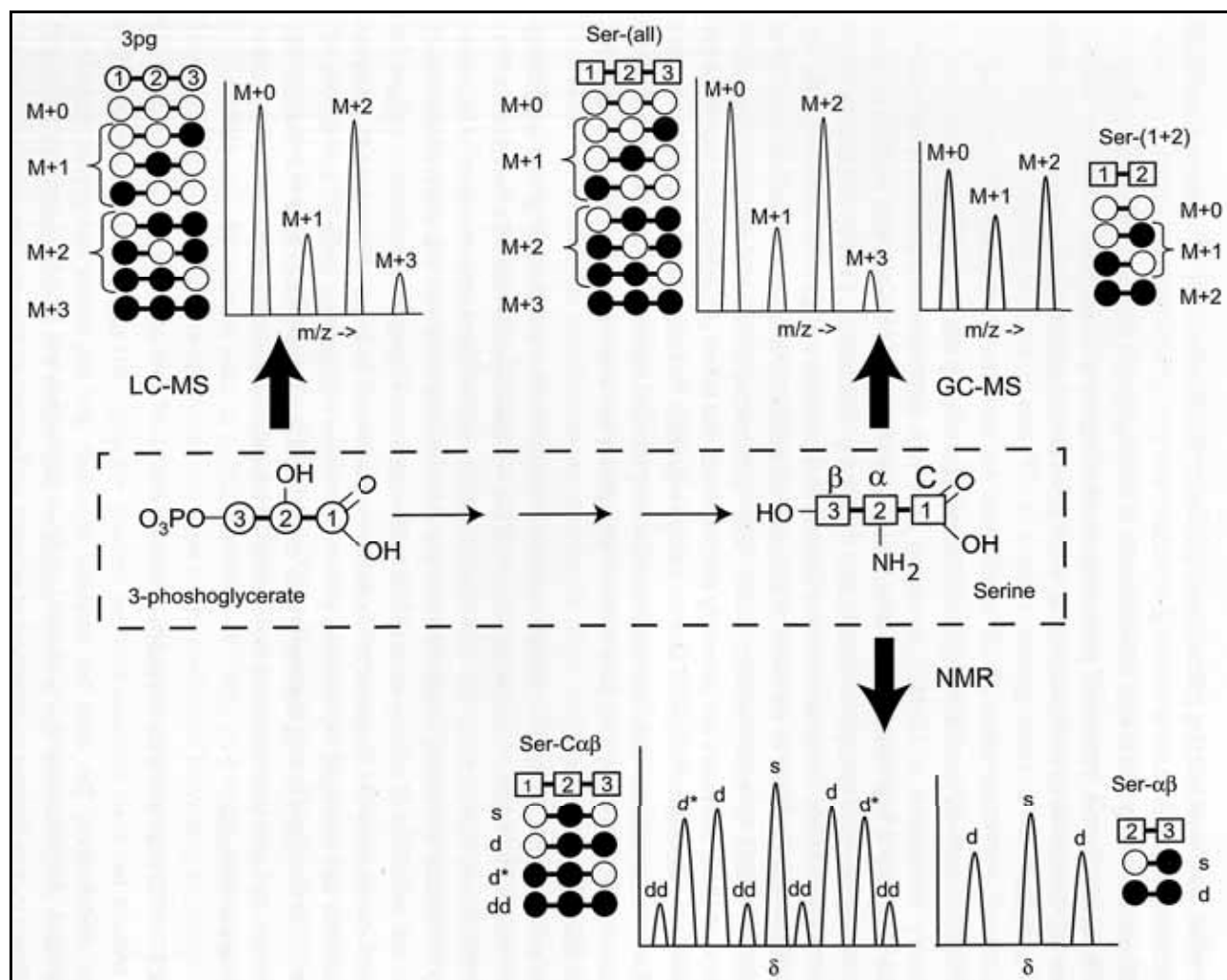


Figura 9. Visió general de les diferents metodologies possibles de quantificació de patrons d'enriament d'aminoàcids i metabòlits intracel·lulars: NMR, GC-MS i LC-MS. La metodologia NMR ofereix l'anàlisi de les intensitats relatives dels fragments d' aminoàcids proteinogènics, en aquest cas concret (Ser-C $\alpha\beta$ i Ser- $\alpha\beta$). Així doncs basant 'nos en el coneixement de les vies metabòliques precursors a la síntesi d'aminoàcids, els patrons de marcatge els metabòlits intracel·lulars poder ser deduïts a partir de les anàlisis NMR GC-MS ofereix l'anàlisi de les fraccions d'isotòmers massics (fragmentats) dels aminoàcids proteinogènics, en aquest cas concret, Ser-(1+2). D'altra banda, LC/GC-MS directament ens ofereix les fraccions dels isotòmers massics, com en aquest cas concret el 3pg.[26]

Metodologies d'anàlisi de fluxos metabòlics basades en dades de ^{13}C

En termes generals, existeixen dues metodologies de càlcul de fluxos metabòlics derivades de les distribucions de patrons de marcatge ^{13}C . L'estratègia d'anàlisi basada en la determinació de fluxos locals i l'estratègia d'anàlisi de tot el model isotopomèric [36]. L'anàlisi de fluxos local determina els fluxos intracel·lulars al voltant del node d'un metabòlit seleccionat mitjançant la interpretació analítica dels patrons de marcatge ^{13}C dels metabòlits veïns. Generalment, les equacions algebraiques relacionen els patrons ^{13}C amb la distribució de fluxos al voltant del node estudiat. D'altra banda, l'anàlisi de tot el model isotopomèric té com a objectiu l'estimació de fluxos a través de tota una xarxa de reaccions prèviament definida. Tenint en compte que totes

les mesures de patrons ^{13}C són ajustades simultàniament, el resultat final del conjunt de fluxos calculat és estadísticament òptim pel conjunt de la xarxa d'estudi, però no necessàriament òptim per a cadascun dels nodes per separat.

Anàlisi de fluxos metabòlics basat en determinació de relacions de fluxos en nodes locals

L'aproximació de càlcul de fluxos a un node local ha estat utilitzada per a quantificar relacions parcials de fluxos individuals [37]. una de les metodologies de càlcul basada en l'anàlisi de fluxos en un node local és la tècnica d'anàlisi metabòlic mitjançant relacions de fluxos (METAFor, **Metabolic Flux Ratio analysis**)[29]. Aquesta metodologia permet quantificar les relacions de contribució de diferents nodes al metabolisme central en un microorganisme determinat amb base a l'anàlisi dels patrons de marcatge dels aminoàcids proteics. La quantificació individual de cada relació (o quocient) de flux és independent de qualsevol altre i no requereix d'una entrada d'informació fisiològica addicional (relacions de conversió extracel·lulars). A més a més, la determinació d'aquestes relacions de fluxos poden ser utilitzades com a restriccions addicionals en l'anàlisi de fluxos metabòlics clàssic, produint una solució global de distribució de fluxos per al model plantejat [38].

El procediment de càlcul METAFor va ser originàriament desenvolupat mitjançant la metodologia d'anàlisi NMR per Szyperski [39], qui formulà una sèrie d'equacions probabilístiques, les quals relacionaven les múltiples intensitats de les abundàncies relatives ^{13}C "valors-*f*" amb les abundàncies relatives de fragments intactes de carboni dels aminoàcids proteics i, per tant, dels seus precursors biosintètics. Aquestes equacions probabilístiques permetien la formulació d'equacions de balanç per cada fragment observat, les quals proporcionaven una acurada informació en el càlcul del flux a través del node observat.

Anàlisi del model isotopomèric complet

Un element indispensable a l'hora de quantificar la totalitat dels fluxos metabòlics és el plantejament d'un model isotopomèric global de tota la xarxa d'estudi. Aquest model isotopomèric definirà el conjunt complet de balanços per a cada fracció d'un isotopomer concret i per a cada metabòlit de la xarxa estudiada. Combinat amb les mesures realitzades d'entrades i sortides (productes secretats, CO_2 produït, substrats consumits) del nostre sistema, el model final relaciona l'enriquiment isotòpic de tots els metabòlits per tots els fluxos intracel·lulars. D'altra banda, degut a la no linealitat dels balanços dels diferents isotopomers, els fluxos no es poden expressar com una funció explícita de les mesures directes de marcatge ^{13}C . En conseqüència, el valor final dels fluxos es calcula de forma iterativa per tal d'ajustar el valor de la distribució ^{13}C simulada al conjunt de patrons de distribució ^{13}C mesurats. El conjunt de distribució de fluxos simulada que millor s'adapta a les dades mesurades determinat per una optimització no lineal és denominat com el "flux òptim".

Un clar avantatge de l'ús d'aquesta metodologia de quantificació és l'obtenció d'una distribució de fluxos de tota la xarxa d'una forma simultània. Degut a la quantificació de fluxos d'entrada o

sortida al sistema, com ara la relació de conversió neta extracel·lular i la composició de biomassa, els valors dels fluxos mesurats són absoluts. A més a més, la gran informació compresa en les mesures ^{13}C restringeix l'ajust del valor final del flux, resultant en un sistema d'equacions sobredeterminat, i permetent el càlcul estadístic dels resultats amb la finalitat de verificar la topologia del model de xarxa metabòlica plantejat inicialment.

Contràriament, un desavantatge a tenir en compte en l'anàlisi del model complet és l'alta connectivitat entre tots els metabòlits intracel·lulars amb un ajust no lineal d'aquest problema. Els errors en la construcció del model donen lloc a simulacions incorrectes de patrons de marcatge ^{13}C , sigui per la manca de certes reaccions que no han estat considerades o per la incorrecta formulació d'aquestes.

Com a resultat, diferents procediments d'ajust ocasionen diferents distribucions de fluxos intracel·lulars. Per tant, és essencial tenir un bon coneixement de la xarxa d'estudi, conjuntament amb una adequada avaluació estadística de l'ajust de fluxos per a una determinació acurada dels fluxos metabòlics finals.

Antecedents d'aquest treball

La producció del major nombre de proteïnes heteròlogues en diferents organismes ha estat una de les principals línies d'investigació durant aquesta última dècada. Així doncs, maximitzar aquesta producció amb el menor cost possible és un dels principals objectius a realitzar, ara bé en moltes ocasions les diferents modificacions genètiques o modificacions de les condicions de cultiu [40] per tal de sintetitzar el producte desitjat provoquen efectes negatius en el creixement [41] [42] i en el consum dels diferents substrats. Aquets efectes son visibles en les diferents mesures macroscòpiques dels diferents cultius realitzats, ara be no es coneix quin pot ser el seu origen.

Per poder observar quin es l'efecte a nivell intracel·lular ocasionat per aquestes modificacions s'ha de realitzar una anàlisi de distribució de fluxos metabòlic (MFA). Durant els darrers anys s'ha utilitzat aquesta tècnica (MFA) conjuntament amb les diferents tècniques d'anàlisi (NMR, LC,GC-MS) per tal d'obtenir un visió més acurada del comportament intern dels diferents organismes i com aquesta distribució de carboni provoca els diferents efectes observats a nivell macroscòpic [43] [44].

Diferents estudis han estat realitzats en aquest grup per tal de quantificar l'impacte de la producció de proteïna utilitzant tècniques de marcatge fraccional ^{13}C en el llevat de *P. pastoris*. [9] [45] tot i que en cap d'ells es va quantificar l'impacte ocasionat en el moment d'utilitzar substrats mixtes (glucosa/metanol) com a fonts de carboni limitant.

Objectius de la Tesi

L'objectiu principal d'aquest treball de Tesi és l'estudi del metabolisme del llevat *P. pastoris* mitjançant tècniques i metodologies d'anàlisi de fluxos metabòlics. Concretament, es vol fer una anàlisi quantitativa del possible impacte de l'estrès cel·lular ocasionat per l'expressió d'una proteïna recombinant en el metabolisme d'aquest llevat, així com les interaccions amb les condicions de cultiu (font de carboni, velocitat de creixement). L'estudi sistemàtic del metabolisme central de carboni, sobretot en condicions com ara el creixement amb assimilació simultània de dues fonts de carboni, les quals afavoreixen majors productivitats, precisa d'una caracterització de l'organisme productor sota les condicions d'estudi preestablertes, a més a més de la construcció d'un model estequiomètric que incorpori la majoria de les rutes metabòliques del microorganisme..

La quantificació acurada de les distribucions fluxos de carboni a través d'una xarxa de reaccions metabòliques requereix l'ús de tècniques de marcatge isotòpic amb ^{13}C . Així doncs, un dels objectius principals d'aquest treball ha estat avaluar i comparar les diferents possibilitats d'anàlisi existents (NMR, LC/GS-MS), dissenyar els diferents experiments de marcatge i analitzar-ne les mostres obtingudes i, finalment, calcular la distribució de fluxos més adient d'acord amb les dades mesurades.

Bibliografia

1. Lee SY, Lee D-Y, Kim TY: **Systems biotechnology for strain improvement.** *Trends in Biotechnology* 2005, **23**:349–58.
2. Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M, Mattanovich D: **Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: When are these systems better than bacterial production systems?** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **89**:939–948.
3. Cereghino JL, Cregg JM: **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2000, **24**:45–66.
4. Ekins A, Martin VJJ, Transport S, Escalante A, Martínez A, Rivera M, Gosset G, Cirino PC: **Cellular Metabolism.** *Genome* 2010, **1**.
5. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G: **Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.** *Journal of Biotechnology* 2007, **127**:335–47.
6. Harder, M. Veenhuis M: **Metabolism of one-carbon compounds.** In *The Yeasts*. 2nd Editio. edited by JS H, AH R New York: Academic Press; 1989:289 – 316.
7. Jungo C, Marison I, Stockar U Von: **Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures.** *Journal of Biotechnology* 2007, **128**:824–837.
8. Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, Von Stockar U: **A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2007, **131**:57–66.
9. Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Szyperski T, Ferrer P: **Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol / methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates.** *Microbiology* 2007:433–448.
10. Rai M, Padh H: **Expression systems for production of heterologous proteins.** *Current Science* 2001, **80**:1121–1128.
11. James C, Ka R: **Transformation.** Cregg JM, Russell KA. *Methods in Molecular Biology* 1998, **103**:27–39.
12. Menendez J, Valdes I, Cabrera N: **The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter.** *Yeast (Chichester, England)* 2003, **20**:1097–108.
13. Delic M, Mattanovich D, Gasser B: **Repressible promoters -- A novel tool to generate conditional mutants in *Pichia pastoris*.** *Microbial Cell Factories* 2013, **12**:6.
14. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2001, **86**:59–70.
15. Serrano A, Cereghino G, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of its gene.** In *Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology.* edited by Merten O-W Kluwer Academic; 2001:259–267.

16. Veenhuis Marten, JP van Dijken, Harder W: **The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts.** *Adv. Microbiology Physiology* 1983, **24**:1–82.
17. Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Claude L: **Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit.** *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **26**:421–430.
18. Beer HD, Mccarthy JEG, Bornscheuer UT, Schmid RD: **Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1998, **1399**:173–180.
19. Lopez N, Perez R, Vazquez F, Valero F, Sanchez A: **Immobilisation of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters.** *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2002, **77**:175–182.
20. Carvalho PDO, Contesini FJ, Ikegaki M: **ENZYMATIC RESOLUTION OF (R, S) -IBUPROFEN AND (R, S) -KETOPROFEN BY MICROBIAL LIPASES FROM NATIVE AND COMMERCIAL SOURCES.** *Brazilian Journal of Microbiology* 2006:329–337.
21. Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H: **Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles.** *Biochemical Engineering Journal* 2001, **8**:39–43.
22. Nunes P a., Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S: **Production of MLM-Type Structured Lipids Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase.** *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2010, **88**:473–480.
23. Goodrick JC, Xu M, Finnegan R, Schilling BM, Schiavi S, Hoppe H, Wan NC: **High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **74**:492–7.
24. Curvers S, Brixius P, Klauser T, Thömmes J, Weuster-Botz D, Takors R, Wandrey C: **Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation.** *Biotechnology Progress* 2001, **17**:495–502.
25. Verheijen PJT: **Data Reconciliation and Error Detection.** In *The Metabolic Pathway Engineering Handbook*. edited by Smoke C CRC Press; 2010, **8**:8.1–8.13.
26. Kleijn R: **Development and Application of ¹³C. (Analyzing the Pentose Phosphate Pathway of *Penicillium chrysogenum*.** 2007.
27. Van Winden W a, Heijnen JJ, Verheijen PJ, Grievink J: **A priori analysis of metabolic flux identifiability from (¹³C)-labeling data.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **74**:505–16.
28. Möllney M, Wiechert W, Kownatzki D, De Graaf a a: **Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments.** *Biotechnology and Bioengineering* 1999, **66**:86–103.
29. Maaheimo H, Fiaux J, Cakar ZP, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T: **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (¹³C) labeling of common amino acids.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2001, **268**:2464–2479.

30. Fischer E, Sauer U: **Metabolic flux profiling of Escherichia coli mutants in central carbon metabolism using GC-MS.** *European Journal of Biochemistry* 2003, **270**:880–891.
31. Van Winden W a, Van Dam JC, Ras C, Kleijn RJ, Vinke JL, Van Gulik WM, Heijnen JJ: **Metabolic-flux analysis of Saccharomyces cerevisiae CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of (13)C-labeled primary metabolites.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:559–68.
32. Cipollina C, Ten Pierick A, Canelas AB, Seifar RM, Van Maris AJ a, Van Dam JC, Heijnen JJ: **A comprehensive method for the quantification of the non-oxidative pentose phosphate pathway intermediates in Saccharomyces cerevisiae by GC-IDMS.** *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2009, **877**:3231–6.
33. Carnicer M, Canelas AB, Pierick A, Zeng Z, Dam J, Albiol J, Ferrer P, Heijnen JJ, Gulik W: **Development of quantitative metabolomics for Pichia pastoris.** *Metabolomics* 2011, **8**:284–298.
34. Lange HC, Eman MR, Van Zuijlen G, Visser D, Van Dam JC, Frank J, De Mattos MJ, Heijnen JJ: **Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in Saccharomyces cerevisiae.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **75**:406–415.
35. Christensen B, Nielsen J: **Isotopomer analysis using GC-MS.** *Metabolic Engineering* 1999, **1**:282–90.
36. Sauer U: **High-throughput phenomics: experimental methods for mapping fluxomes.** *Current opinion in Biotechnology* 2004, **15**:58–63.
37. Kelleher JK: **Flux Estimation Using Isotopic Tracers: Common Ground for Metabolic Physiology and Metabolic Engineering.** *Metabolic Engineering* 2001, **3**:100–110.
38. Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K: **Metabolic fluxes in riboflavin-producing Bacillus Subtilis.** *Nature Biotechnology* 1997, **15**:448–452.
39. Szyperski T: **Biosynthetically directed fractional 13C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1995, **232**:433–448.
40. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P: **A multi-level study of recombinant Pichia pastoris in different oxygen conditions.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**:141.
41. Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P: **Expression of a Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter.** *Journal of Biotechnology* 2004, **109**:103–13.
42. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in Pichia pastoris fed-batch cultures.** *Journal of Biotechnology* 2005, **116**:321–335.
43. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A: **Carbon metabolism limits recombinant protein production in Pichia pastoris.** *Biotechnology and Bioengineering* 2011, **108**:1942–1953.
44. Zhao Z, Pierick A ten, Jonge L de, Heijnen JJ, Wahl A: **Substrate cycles in Penicillium chrysogenum quantified by isotopic non--stationary flux analysis.** *Microbial Cell Factories* 2012.

45. Carnicer M, Pierich A Ten, Dam J Van, Heijnen JJ, Albiol J, Gulik W Van, Ferrer P: **Quantitative metabolomics analysis of amino acid metabolism in recombinant pichia pastoris under different oxygen availability conditions.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:83.

Introducció

Per la construcció de models metabòlics es precisa d'una acurada informació de l'estat fisiològic cel·lular en les condicions d'operació establertes [1][2]. La validació d'aquets models complexos rau en el fet de l'obtenció de dades experimentals correctes d'un gran nombre de fluxos metabòlics, els quals estan directament relacionats amb precursors biosintètics. El coneixement de totes les vies metabòliques relacionades amb la producció de biomassa juga un paper fonamental a l'hora de realitzar un càlcul de la distribució de fluxos [3][4]. Si considerem que les cèl·lules estan formades per diferents tipus de polímers i macromolècules, el coneixement de la seva composició i quantitat per a cada cas concret d'estudi és essencial per realitzar una bona determinació de la contribució del consum de precursors per a la seva síntesi en la distribució de fluxos de la xarxa global. Tot i això, encara avui en dia és complicada l'obtenció de dades macromoleculares bibliogràfiques per a diferents microorganismes en diferents condicions de cultiu.

En aquest capítol s'ha realitzat la caracterització en termes de composició de biomassa del llevat *P. pastoris* sota condicions d'expressió d'una proteïna recombinant model, utilitzant com a font de carboni mescles de diferents substrats multicarbonats amb metanol.

Material i Mètodes

Soques

Experiments glucosa/metanol

En els estudis on es varen fer servir mescles glucosa/metanol com a font de carboni, es va utilitzar una sèrie de soques recombinants derivades de la soca comercial *P. pastoris* X-33 (invitrogen). Com a control negatiu de l'expressió de proteïna recombinant s'utilitza la soca X-33 amb el plàsmid pGAP α A (invitrogen) incorporat [5]. D'altra banda s'utilitzaren dues soques productores de la lipasa ROL per tal d'avaluar el possible impacte d'expressió en la distribució de fluxos intracel·lulars, concretament:

- X-33/pPICZA α -ROL obtinguda prèviament [6], la qual conté una única còpia del gen d'expressió ROL sota el control del promotor AOX1. Durant el transcurs d'aquesta tesi, aquesta soca serà referenciada com a ROL_1.
- Una segona soca (multicòpia) construïda per aquest estudi, utilitzant com a punt de partida la soca X-33 amb el plàsmid pPICZA α -ROL, seguint una transformació mitjançant un procés d'electroforesi [7]. Durant el transcurs d'aquesta tesi, aquesta soca serà referenciada com a ROL_2.

Per l'elecció de la soca òptima ROL_2, els transformats obtinguts foren seleccionats amb plaques d'agar i YPD amb una concentració inicial de 100 mg.L⁻¹ de zeozina (invitrogen). Posteriorment, es van realitzar re-sembres consecutives en placa, amb el mateix medi incrementant la concentració de zeozina fins 1000 mg.L⁻¹, seguint aquesta estratègia com a selecció de transformats amb múltiples còpies del gen ROL tal i com està descrit en la

bibliografia [8][9]. Finalment la selecció del clon amb més alts nivells d'expressió s'efectuà amb un test d'activitat lipolítica extracel·lular utilitzant 10 possibles candidats i realitzant cultius amb erlenmeyers, descrit en el *Pichia Expression Kit Manual* (Invitrogen). El millor clon fou seleccionat pels posteriors estudis amb experiments amb continu. Totes dues soques foren caracteritzades en termes de quantitat del gen ROL expressada, mitjançant una anàlisi quantitativa amb PCR en temps real.

Experiments glicerina/metanol

En aquesta part de l'estudi s'utilitza com a soca model *P. pastoris* X-33/pPICZA α -ROL com a únic sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues. Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior és la soca salvatge amb el fenotip X-33 (invitrogen) i el plàsmid pPICZA α -ROL integrat en el promotor AOX1.

Condicions de cultiu

Experiments amb glucosa/metanol

Per a les diferents condicions d'aquest estudi es varen portar a terme duplicats biològics en condicions aeròbiques i amb condicions de carboni limitant. Es va escollir el bioreactor (Applikon Biotechnology) de 3 litres de capacitat màxima controlat a 25°C per realitzar els cultius. El volum de treball es fixà en 1 litre, controlat mitjançant una cànula ajustada al volum desitjat. El pH es mantingué constant a 5.0 controlat amb l'addició de NH_3 1M. El cabal d'aeració fou constant durant tot el procés a 1 l/min, sota les condicions d'operació de 25°C i pressió de 1.2 atmosferes, controlat pels cabalímetres màssics, la velocitat d'agitació va ser ajustada a 800 rpm, permeten un percentatge mínim d'oxigen dissolt a l'interior del bioreactor superior al 15%. El sistema en continu es mantingué sota una sobrepressió de 0.2 bars per facilitar la presa de mostra. L'addició d'aliment es mantingué a una velocitat de creixement de 0.09L/h, i tenint en compte el volum de treball d'1L, tots els cultius es realitzaren a una D de 0.09h $^{-1}$ constant. La composició del medi va ser idèntica a la descrita en treballs previs [10], amb un contingut de font de carboni de 50 g.L $^{-1}$ d'una mescla de glucosa/metanol (80% glucosa/ 20% metanol). La línia de gasos procedent del bioreactor es refreda mitjançant un condensador (4°C), per tal d'evitar la possible evaporació de metanol ("stripping"), secada mitjançant dues columnes de sílica gel i finalment analitzada mitjançant dues sondes de gasos BCP-CO $_2$ i BCP-O $_2$ (Blue-Sens). Prèviament, totes dues sondes es calibraren utilitzant 3 mescleres de gasos CO $_2$ /O $_2$ /N $_2$ amb diferent concentració. Mostres en estat estacionari es realitzaren després d'un mínim de 5 temps de residència a partir de la finalització de la etapa prèvia en discontinu ("batch") del cultiu.

Experiments amb glicerina/metanol

Seguint la mateixa metodologia utilitzada per al cas glucosa/metanol, es van realitzar duplicats biològics en condicions aeròbiques per les diferents condicions establertes. Els cultius en continu van ser alimentats amb un medi mínim definit [10]. Les diferents concentracions de mescles glicerina metanol avaluades foren les següents: (80%-20%),(60%-40%),(40%-60%), percentatges en pes/pes de la mescla glicerina/ metanol.

Els experiments en continu es realitzaren seguint la mateixa metodologia establerta per al cas comentat anteriorment. La temperatura d'operació es fixa a 30°C mentre que el control de pH es mantingué constant a 5.5 mitjançant l'addició de KOH 1M. El cabal d'aeració i l'agitació aplicada a l'interior del reactor va ser el mateix que per al cas glucosa/metanol.

Anàlisi de Biomassa

Determinació del contingut de cendres

Per quantificar el contingut de cendres, 20 ml del brou de cultiu van ser extrets i centrifugats a 5000 rpm durant 5 min. Un cop rebutjat el sobrenedant, el pellet romanent es neteja amb 20 ml de Tris-HCl 20mM a pH 7.6. Aquesta última operació de neteja es realitza per duplicat. Les cèl·lules resuspeses foren filtrades mitjançant un filtre de fibra de vidre (Millipore) prèviament pesat, i assecades a 100°C durant 12-16 hores. La posterior combustió de la biomassa seca, per a determinar el contingut en cendres, es realitzà traspasant el contingut del filtre de vidre dintre d'un recipient ceràmic (Millipore), introduït en un forn (Hengstler) a 550°C durant 12 hores.

Liofilització de la biomassa

Per la majoria d'anàlisis realitzades durant el transcurs d'aquest treball s'utilitza biomassa liofilitzada. La mostra de cultiu es centrifuga a 13000 rpm durant 1 min, es rebutja el sobrenedant i es neteja amb el mateix volum de Tris-HCl 20mM a pH 7.6 que quantitat de brou de cultiu extreta del bioreactor. El pellet romanent va ser immediatament congelat mitjançant la immersió d'aquest en una mescla d'acetona amb gel sec i seguidament introduït en un evaporador de buit (Virtys Sentry) durant 24 hores.

Anàlisi elemental de la biomassa

La composició elemental de la biomassa fou determinada analitzant 1 mg del pellet liofilitzat, addicionant-li 1 mg de V₂O₅ i introduint la mostra en un forn a 1000°C. Els components volàtils resultants foren analitzats i quantificats amb un analitzador de compostos elementals (NA2100 ThermoFisher).

Anàlisi de la composició d'aminoàcids

Mostres de 40 mg de biomassa liofilitzada van ser hidrolitzats amb 3 ml d'HCl 6M a 105°C durant 24 hores. Durant la hidròlisi, un cabal constant de N₂ es va utilitzar per desplaçar tot l'O₂ romanent en la mostra, minimitzant així la possible oxidació durant el procés. Seguidament es va addicionar aigua desionitzada (MilliQ) fins completar un volum final de 50 ml. Un volum de 500 µl de la mostra diluïda es mescla amb 100 µl de Nor-leucina 2500 µM (aminoàcid no proteinogenic utilitzat com patró intern), aquest aminoàcid va ser mesclat amb la mostra, prèviament a l'etapa d'evaporació.

El pellet resultant va ser redissolt amb 1ml de solució tampó a pH 2.2 i posteriorment filtrat mitjançant ultra-centrifugació utilitzant un filtre de 10000 Da. de tall (Microcon YM10;42408). Un volum final de 50 µl es va injectar en un analitzador d'aminoàcids (Biochrom 30; Biochrom UK, software: *EZ Chrom*), utilitzant una columna cromatogràfica d'intercanvi de cations amb una posterior derivatització amb ninhidrina, [11]. Per a la posterior identificació de cada aminoàcid, l'eluent (tampó de citrat de liti) s'escalfa fins 135°C i posteriorment va ser mesclat amb ninhidrina. L'exacta identificació de cada aminoàcid es realitza d'acord amb el temps de retenció estàndard en les condicions d'operació. La posterior quantificació de cada àrea es realitza mitjançant un calibratge previ amb una solució estàndard de concentració coneguda. El límit de detecció de la metodologia va ser d'aproximadament 1 nmol amb una reproductibilitat 1.5% per 10 nmol.

Anàlisi del contingut de proteïna total

El contingut de proteïna total es determina mitjançant la metodologia de Lowry [12], a partir d'una solució de biomassa liofilitzada de 0.5 g/l de pes sec. La concentració de proteïna total es quantifica utilitzant BSA com solució estàndard. D'altra banda s'utilitza la suma total d'aminoàcids % pes/pes com a segona aproximació del contingut de proteïna total.

Anàlisi del contingut de carbohidrats total

El contingut de carbohidrats total es determina mitjançant la metodologia descrita en [12]. A 1 ml de mostra de biomassa prèviament liofilitzada (0.1 mg biomassa seca/ml) es mescla amb 1 ml de fenol al 5% + 5 ml d'àcid sulfúric al 96%. Després d'una espera de 10 min els tubs van ser refredats (15 min a 25°C). Seguidament es mesura l'absorbància a una longitud d'ona de 488 utilitzant glucosa com a solució patró. Finalment els resultats es corregiren per la presència d'àcids nucleics, utilitzant una absorbància relativa de 0.455 i 0.264 per RNA i DNA respectivament [13].

Anàlisi del contingut de lípids total

L'extracció de lípids de les mostres de biomassa liofilitzades es realitzà seguint la metodologia descrita en [14]. Breument, 150 mg de biomassa prèviament liofilitzada fou extreta amb una mescla d'hexà/isopropanol (3:2 volum-volum) durant una nit. Després de l'addició de Na_2SO_4 0.47 M, les dues fases formades es separaren amb l'ajut d'un pas de centrifugació. La fase d'hexà es recuperà i evaporà amb l'ajut d'un cabal de N_2 sec. L'increment del pes sec dels tubs es considera com a valor de lípid total. Seguidament el pellet va ser redissolt en cloroform i analitzat amb una tècnica de cromatografia de capa fina, utilitzant plats de sílica gel (Merck) amb una fase mòbil de cloroform, metanol, aigua i àcid acètic (345:133:21:3). L'estàndard fou analitzat en paral·lel contenint àcid fosfàtic (Sigma), fosfatidil serina (Fluka), fosfatidil glicerina (Sigma), cardiopina (Sigma), fosfatidil etanolamina (Sigma), fosfatidil inositol (Sigma), fosfatidil colina (Sigma), ergosterol (Fluka) i triacilglicèrids (Sigma) utilitzant un rang de concentracions d'entre 1 i 8 mg per cada estàndard. Després de córrer la cromatografia els plats foren impregnats amb iode o amb "Sudan Black". Les imatges obtingudes varen ser quantificades utilitzant el *software* Multi gauge (Fujifilm), comparant les intensitats de la mostra amb les obtingudes a través dels estàndards.

Anàlisi del contingut de DNA total

El contingut de DNA en la biomassa va ser determinat mitjançant un mètode de fluorescència "Hoechst dye" [15]. Breument, mostres de biomassa liofilitzada van ser redissoltes amb un tampó de TNE (NaCl 1M, EDTA 10 mM, Tris·HCl 0.1 M a pH 7.4) a una concentració final de 25 mg/ml. La solució resultant es mescla amb 2 ml de la solució de "Hoechst dye" (Hoechst 33258 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amb tampó TNE). La fluorescència resultant va ser mesurada utilitzant ones d'excitació/emissió al voltant de 356/468. Finalment, el contingut de DNA total es calcula mitjançant la interpolació amb la corba de calibratge realitzada amb un estàndard de DNA (solució sòdica de DNA provinent de vedella; Sigma-Aldrich).

Anàlisi del contingut de RNA total

El contingut de RNA en la biomassa va ser determinat seguint la metodologia descrita per Benthin [16]. Breument, 5 mg de biomassa liofilitzada foren redissolts amb 10 ml de HClO_4 0.7 M fred i incubat durant aproximadament 5 min. Seguidament la solució va ser centrifugada a 8000 rpm durant 10 min a 4°C, rentada dos cops i resuspesa en 10 ml de KOH 0.3 M. Un cop realitzades les dues etapes de centrifugació dues alíquotes de 5 ml foren incubades a 37°C durant 1 hora. Després d'un temps de refredament (10 min) 1 ml de HClO_4 3M fred s'addicionà a cadascuna de les alíquotes i es centrifugà en les mateixes condicions esmentades anteriorment. El sobrenedant es recuperà i el pellet es rentà dos cops amb 1 ml de HClO_4 0.5 M. Els diferents sobrenedants recollits van ser mesclats i posteriorment es mesurà l'absorbància a 260 nm utilitzant cubetes de quars. El % de RNA total present en la mostra s'interpreta com la relació $A_{260} \cdot 0.038 \text{ mgRNA}/\text{ml}$ a més de tenir en compte la dilució de la mostra realitzada.

Quantificació de la proteïna ROL

Assaig de l'activitat lipolítica

L'assaig enzimàtic de l'activitat lipàsica es realitza segons la metodologia colorimètrica descrita per l'empresa Roche (Mannheim, Alemanya), utilitzant el *kit* comercial (*lipase colorimètric assay Roche kit 11821792*). Aquesta metodologia és fonamenta en el seguiment de la formació de metilresorufina, degut a la reacció enzimàtica, a partir de la hidròlisi de l'ester cromàtic 1,2-O-dialuril-rac-glicero-3-àcid glutàric-(6'-metilresorufina). La intensitat cromàtica del colorant roig format, és directament proporcional a l'activitat lipàsica, de manera que el seguiment de l'absorbància de la mescla de l'assaig amb el temps ens permet determinar l'activitat. La mescla utilitzada es realitza en cubetes d'1.5 ml (Brand GMBH, Wertheim, Germany) seguint el protocol següent:

- a. 300 ml de substrat (*kit* colorimètric)
- b. 500 ml de tampó Tris-HCl (200 mM) + CaCl₂ (5mM), pH=7.25
- c. 500 ml de mostra

La mesura de l'absorbància amb el temps es realitza mitjançant un espectrofotòmetre Cary 300, a 30°C i a una longitud d'ona de 580 nm. La determinació de la pendent de la recta d'absorbància front el temps esta directament relacionada amb les unitats d'activitat per ml de la mostra Eq. 2.1, definint com a unitat d'activitat la quantitat d'enzim necessària per a produir un μmol de producte per minut, sota les condicions descrites.

$$\text{Activitat} \left(\frac{UA}{ml} \right) = 2.16 \cdot \text{pendent}(\text{min}^{-1}) - 0.016 \quad \text{Eq 2.1}$$

Determinació de la proteïna total extracel·lular

La concentració de proteïna total extracel·lular de cada mostra va ser determinada per la metodologia colorimètrica de Bradford (Bradford, 1976) utilitzant un *kit* de *Pierce Coomassie Protein Assay kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Aquesta metodologia es basa en la reacció dels aminoàcids aromàtics amb el colorant Coomassie G-250, generant un complex que pot ser quantificat a 595 nm mitjançant un espectrofotòmetre (Multiskan FC, Thermo Scientific Waltham, USA). Tots els assajos es realitzaren en plaques de 96 pous (Microtiter plate flat from individually wrapped, Sudelab, Chile) mesclant-se 200 μl de colorant amb 7 μl de mostra en cada pou. S'utilitzà com a patró sèrum d'albúmina boví (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Com a control negatiu del mètode s'utilitza aigua destil·lada

SDS-PAGE + Densitometria

L'electroforesi en gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) al 12% es duagué a terme en un Mini-Protean II (BioRad, CA, USA), seguint la metodologia estàndard recomanada pel seu fabricant i d'acord amb el procediment descrit a Laeml [17]. Totes les mostres van ser tractades amb el tampó reductor (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4% w/v, blau de bromo fenol 10% w/v i 2-mercaptoetanol 10% v/v) durant 15 minuts a una temperatura de 98 °C. El marcador de pes molecular utilitzat va ser el "*Low range protein marker*" (BioRad, CA, USA). Posteriorment els gels resultants foren tenyits durant 24 hores amb una solució col·loïdal de Coomassie G250 (34% v/v etanol, 2% v/v H₃PO₄, 17% (NH₄)₂SO₄ i 0.066% de Coomassie G250).

Un cop el gel fou finalitzat, es realitzà una densitometria de totes les bandes obtingudes, per tal d'avaluar el % total de la proteïna d'interès en el medi extracel·lular.

Concentracions del brou de cultiu

El seguiment de la biomassa cel·lular a l'interior del bioreactor es realitza mitjançant l'anàlisi de densitat òptica a 600 nm (OD₆₀₀). Per la determinació del pes sec, un volum conegut del brou de cultiu es filtra utilitzant filtres de fibra de vidre (Millipore de 45 µm) - prèviament pesats- amb un posterior rentat (H₂O) amb el mateix volum de mostra per duplicat. Els filtres s'assecaren a 100°C durant 24 hores.

Les mostres per les diferents anàlisis extracel·lulars foren centrifugades a 10000 rpm durant 2 min per tal d'eliminar la biomassa i seguidament filtrades amb filtres de 0.45 µm (Millipore type HAWP). Glucosa, metanol, glicerina i tots els possibles productes van ser analitzats mitjançant HPLC (Series 1050, Hewlett Packard), utilitzant una columna d'intercanvi iònic (Bio-Rad, Aminex HPX-87H), com a fase mòbil s'utilitzà una solució 15 mM d'àcid sulfúric.

Resultats i Discussió

En aquest treball, diferents composicions de biomassa han estat avaluades tenint en compte font de carboni, velocitat de creixement, proporcions de mescla de substrats i finalment expressió de proteïna heteròloga.

Durant el primer bloc d'experiments s'utilitzà un substrat mixt format per glucosa/metanol, com a font de carboni on s'avaluà l'impacte de l'expressió de proteïna en soques amb diferent quantitat del gen d'interès.

En el segon bloc s'utilitzà una soca determinada (X-33 ROL_1) i es canviaren les condicions experimentals, composició de font de carboni i velocitat de creixement, amb la premissa d'observar quin d'aquests factors podria provocar un impacte més acusat en el metabolisme central de carboni.

Per a cadascun dels diferents casos d'estudi, es realitza un quantificació detallada de la composició de biomassa. Els diferents anàlisis realitzats a les mostres extretes dels diferents cultius realitzats poden ser englobats en dos nivells diferents, tenint com a resultat una

descripció elemental o molecular de tots els constituents que formen part d'aquesta. Les diferències i les similituds observades en aquests dos nivells ens han servit per poder descriure una composició específica per a cada cas concret.

Composició Molecular de la biomassa

Observant el nivell molecular, la composició de la biomassa és usualment descrita en referència al grup de constituents majoritaris que podem identificar; principalment proteïnes, carbohidrats, lípids, DNA i RNA. D'altra banda, en alguns casos algun d'aquests grups també pot ser descrit pels seus elements principals. Aquest procediment ens permet determinar no solament la fracció màssica de cada constituent en el conjunt total o la fórmula elemental global, sinó que també poden ser determinats quins precursors metabòlics són necessaris i la quantitat requerida per la biosíntesis.

Taula 2.1 Composició d'aminoàcids del contingut de proteïna total dels experiments amb barreja glucosa/metanol a una \square de $0.09h^{-1}$ comparats amb experiments amb glucosa pura a \square de $0.1h^{-1}$.

% mol/mol	80 % Glucosa 20 % Metanol			100 % Glucosa	
	X-33	ROL_1	ROL_2	X-33*	<i>S. cerevisiae</i> **
Arg	8.15	7.67	6.45	7.04	3.86
Asx	9.25	9.48	10.05	8.78	9.28
Thr	6.15	6.06	6.46	5.88	5.57
Ser	6.34	6.32	6.82	6.26	5.33
Glx	15.76	15.44	13.23	17.81	15.48
Pro	4.2	4	3.92	3.83	4.22
Gly	7.8	7.53	7.86	6.86	8.89
Ala	11.14	9.41	9.36	10.4	9.77
Val	6.81	6.67	6.54	5.88	7.33
Cys	0.17	0.19	0.13	0.15	0.14
Met	0.78	0.75	0.62	0.79	1.14
Ile	4.49	4.49	4.69	4.64	5.89
Leu	7.5	7.45	8.34	6.96	8.01
Tyr	2.28	2.19	2.51	2.16	1.96
Phe	3.44	3.31	3.61	3.2	3.76
Orn	0.68	0.32	0.26	1.04	0.24
Lys	6.77	6.77	7.21	6.41	6.57
His	2.1	1.94	1.95	1.89	1.93
Trp	1	1	1	1.4	1.96

* Valors extrets de [5]; **Valors extrets de [13]

Taula 2.2. Composició d'aminoàcids del contingut de proteïna total dels experiments amb barreja glicerina metanol a diferents velocitats d'alimentació. Els % reflecteixen la proporció de glicerina/metanol en el tanc d'alimentació.

%mol /mol	Experiment a \square de 0.05 h ⁻¹			Experiment a \square de 0.16 h ⁻¹		
	80% 20%	60% 40%	40% 60%	80% 20%	60% 40%	40% 60%
Asx	9.50	9.75	10.10	9.18	8.81	9.20
Thr	6.52	6.47	6.52	6.29	6.09	6.06
Ser	6.42	6.38	6.52	6.43	6.17	6.25
Glx	14.22	13.97	13.06	15.29	16.17	15.82
Pro	4.92	5.14	5.26	4.69	4.58	4.62
Gly	7.66	7.92	8.22	7.56	7.39	7.65
Ala	8.69	8.52	8.69	10.36	10.89	9.40
Val	5.68	5.55	5.83	5.65	5.42	5.55
Cyst	0.72	0.33	0.05	0.06	0.06	0.06
Met	0.52	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00
Ile	4.39	4.40	4.62	4.44	4.26	4.38
Leu	7.16	7.17	7.58	7.07	6.79	7.01
Tyr	2.71	2.57	2.49	2.02	2.16	2.14
Phe	3.39	3.48	3.49	3.23	3.13	3.20
Lys	6.53	6.53	6.76	6.91	6.83	6.96
His	1.94	2.44	2.41	2.04	1.98	2.12
Trp	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Arg	7.55	7.93	6.99	7.05	7.58	8.00

Els valors de Nle (Norleucina) i Orn (Ornitina) no foren detectats en cap dels anàlisis realitzats

Contingut d'aminoàcids i proteïna total

Com ja és conegut, un dels components majoritaris de la biomassa són les proteïnes, les quals representen al voltant d'un 50% del pes sec del microorganisme [18]. Així doncs, un coneixement detallat d'aquesta composició és important per qualsevol càlcul metabòlic o energètic. En conseqüència, com fins el moment no es disposa de dades de composició en coassimilació de substrats pel cas de *P. pastoris* expressant una lipasa com a proteïna recombinant, es precisa d'una determinació d'aquesta composició per a cadascun dels experiments realitzats. En la Taula 2.1 i en la Taula 2.2 es mostren els valors obtinguts dels diferents experiments realitzats. Pel cas amb glucosa/metanol com a mescla de font de carboni, les taules ens mostren que existeixen diferències per sobre del 10% quan es compara la soca control amb les dues soques productores, incrementant-se aquesta diferència entre la soca control amb la ROL_2. Tenint en compte l'error de l'anàlisi, entre un (3-5)% del valor absolut de la mesura, per la majoria de valors d'aminoàcids obtinguts no s'observen diferències significatives. D'altra banda, existeixen alguns aminoàcids com ara (Thr, Glx, Ala, Cyst, Met, Orn, Arg) on sí que s'observen diferències significatives. A més a més, observant la soca control sota condicions de creixement amb diferent font de carboni (glucosa o glucosa/metanol), també s'observen diferències significatives en alguns aminoàcids (Thr, Glx, Val, Gly, Cyst, Orn, Trp,

Arg). Així doncs, es va decidir utilitzar diferents composicions pels tres casos concrets en lloc d'utilitzar els valors descrits [5] amb glucosa pura com única font de carboni.

D'altra banda, en referència als experiments amb glicerina/metanol (Taula 2.2), no s'observaren diferències significatives entre els experiments amb la mateixa velocitat de creixement, o sigui que el fet d'alimentar al sistema amb diferents relacions de la mescla glicerina/metanol té un impacte poc significatiu en la composició de biomassa final. Ara be, comparant els experiments a diferent velocitat de creixement, sí que s'observaren diferències significatives en alguns dels aminoàcids mesurats com ara (Asx, Thr, Glx, Pro, Gly, Ala, Cyst, Tyr).

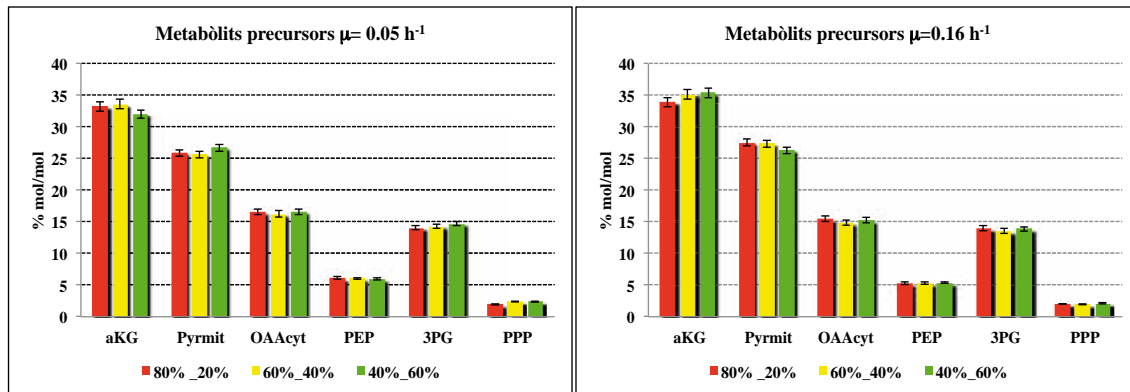


Figura 2.1 Quantitat de metabòlits requerida per la síntesi d'aminoàcids amb barreges de glicerina/metanol a diferents velocitats d'alimentació.

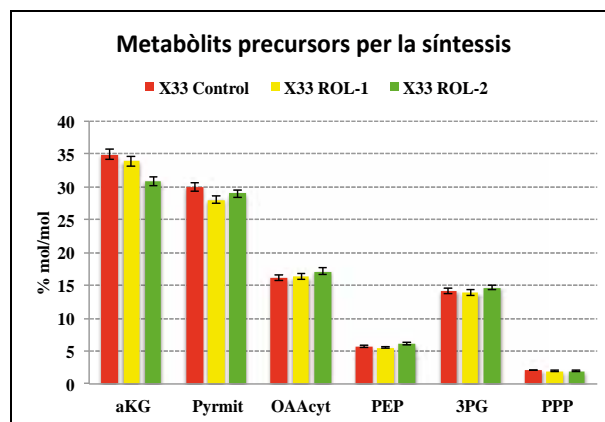


Figura 2.2 Quantitat de metabòlits requerida per la síntesi d'aminoàcids amb sota creixement amb glucosa/metanol a $\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$ amb diferent càrrega del gen ROL.

Observant les Figures 2.1 i 2.2, es pot observar la demanda de precursor necessària per la producció de proteïnes cel·lulars (mols de cada aminoàcid per 100 mols d'aminoàcid total). Depenent de l'origen de síntesi de cadascun dels aminoàcids, aquets s'agruparen en els metabòlits representats en les figures anteriors tenint en compte les vies de síntesi conegudes per *P. pastoris* [19][20]. Els requeriments de precursors metabòlics demandats pels diferents casos d'estudi mostren lleugeres tendències en la Figura 2.1 amb diferent velocitat de creixement, o quan s'observa la Figura 2.2 amb diferent quantitat de proteïna recombinant secretada. Llavors és d'esperar que aquestes variacions puguin influenciar en el resultat final de

distribució de fluxos, fet que ens reafirma la utilització de diferents composicions per cada cas en concret.

La quantitat de proteïna total s'estima considerant per una banda la suma de tots els aminoàcids mesurats i per l'altra mitjançant la metodologia Lowry descrita anteriorment. Totes dues quantificacions amb les seves incerteses foren utilitzades per el pas de reconciliació del valor final.

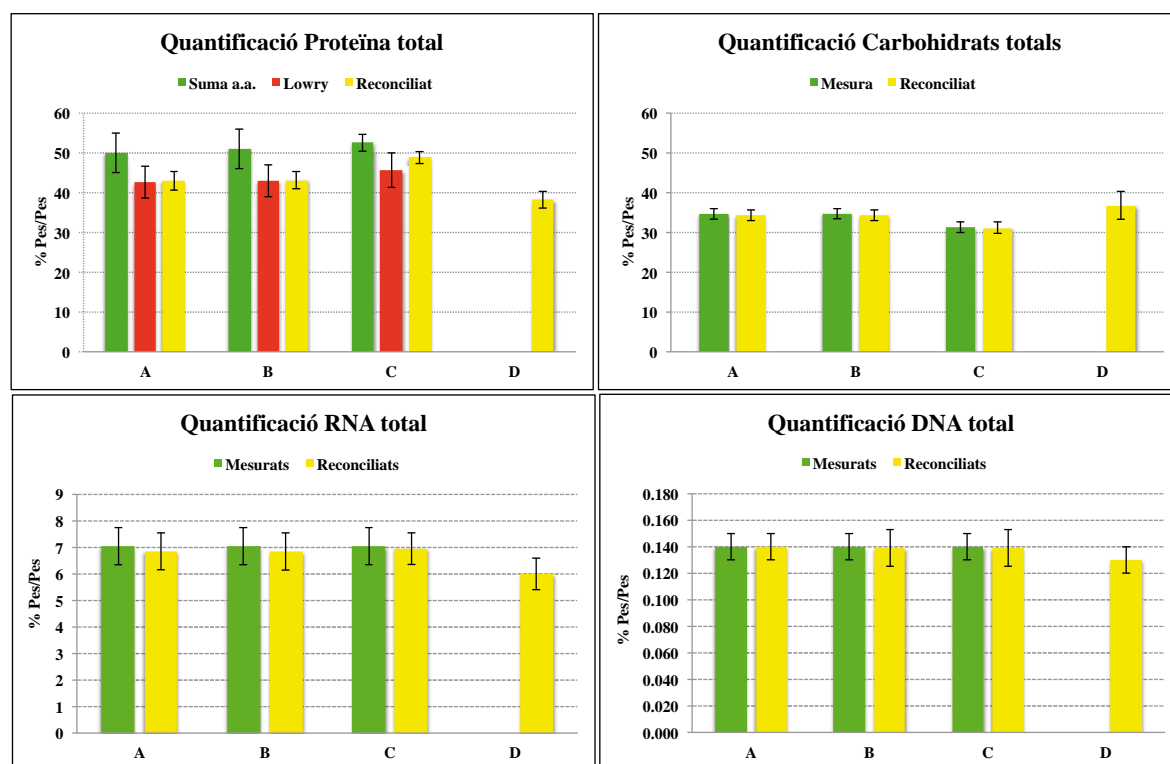


Figura 2.3 Resum dels diferents constituents de la biomassa mesurats per al cas de barreges amb glucosa/metanol. A: X-33 ROL_1. B: X-33 ROL_2. C: X-33 Control. D: X-33 Control amb glucosa com única font de carboni [5].

Tal i com s'observa en la Figura 2.3 per al cas de glucosa/metanol, el valor reconciliat per la quantitat de proteïna total és més elevat en la soca de referència que en les soques expressives, valor esperat degut a l'impacte en el rendiment descrit anteriorment en diferents treballs [21][9], com a conseqüència de l'expressió de proteïna. Aquesta producció ocasiona una situació d'estrès en el conjunt de la cèl·lula amb un menor creixement sota condicions d'operació equivalents. Per al càlcul del contingut proteic total, la síntesi de ROL no es tingué en compte, ja que aquesta és molt minoritària en el contingut de proteïna total secretada al medi (representa entre el 45-50 % del total de proteïna extracel·lular) i que la quantitat total secretada al medi representa un 0.6% de la quantitat total present en la biomassa. D'altra banda, la quantificació de proteïna secretada (Figura 2.4 B) es tingué en compte per als càlculs de distribucions de fluxos.

B)

Distribució de fluxos en *P. pastoris* mitjançant metodologia ^{13}C

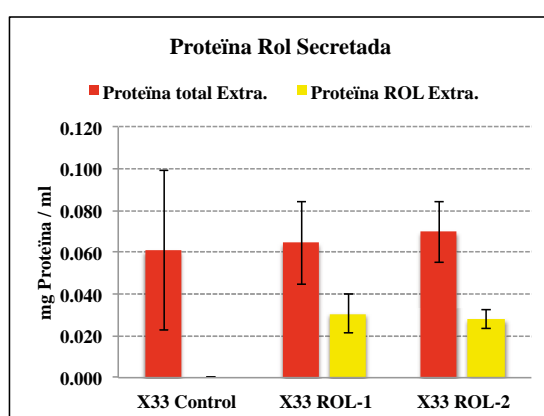
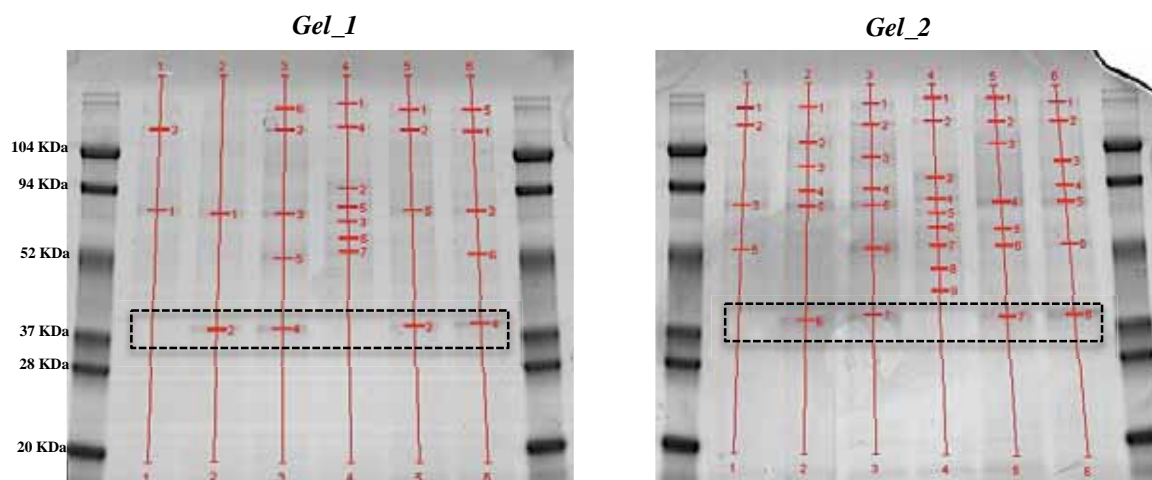


Figura 2.4 A) SDS-PAGE de les fermentacions amb glucosa metanol per tal d'obtenir la quantitat de proteïna ROL extracel·lular secretada. Carrils 1 i 4 representen la soca control; carrils 2 i 5 representen la soca productora ROL_1; finalment carrils 3 i 6 representen la soca productora ROL_2. B) **Quantitat de proteïna ROL secretada respecte el total de proteïna extracel·lular.**

Contingut de RNA i DNA total

Per el càlcul del contingut de RNA i DNA, utilitzant glucosa/metanol com a font de carboni, es va considerar que eren equivalents als mesurats prèviament a velocitats de creixement similars i per tant s'utilitzaren els valors mesurats descrits per glucosa com a única font de carboni en condicions d'aeració total per realitzar el pas de reconciliació [5].

D'altra banda, pels experiments amb barreges glicerina/metanol es va realitzar una mesura alternativa, ja que fins al moment no es coneixen dades macromoleculares amb glicerina com única font de carboni, ni el possible efecte en la composició final del fet d'utilitzar diferents velocitats de creixement. Així doncs, tal i com es pot observar en la Figura 2.5, per mesclades de glicerina/metanol, el contingut de RNA total és inferior a velocitats de creixement menors, no observant-se diferències estadísticament significatives quan es comparen diferents proporcions de font de carboni a la mateixa velocitat de creixement.

Contràriament, els valors de DNA mostren un patró de comportament oposat als valors de RNA, incrementant el seu % en la biomassa total a mesura que la relació glicerina/metanol disminueix. En la Figura 2.5 (part de sota a la dreta), les diferències observades són més acusades entre diferents velocitats d'alimentació (creixement) que entre diferents relacions de substrats. Donat que els càlculs són en percentatge, es probable que la quantitat d'aquests àcids nucleics sigui similar per a una mateixa velocitat de creixement i que les diferències observades siguin degudes a l'augment o disminució relativa dels altres components majoritaris.

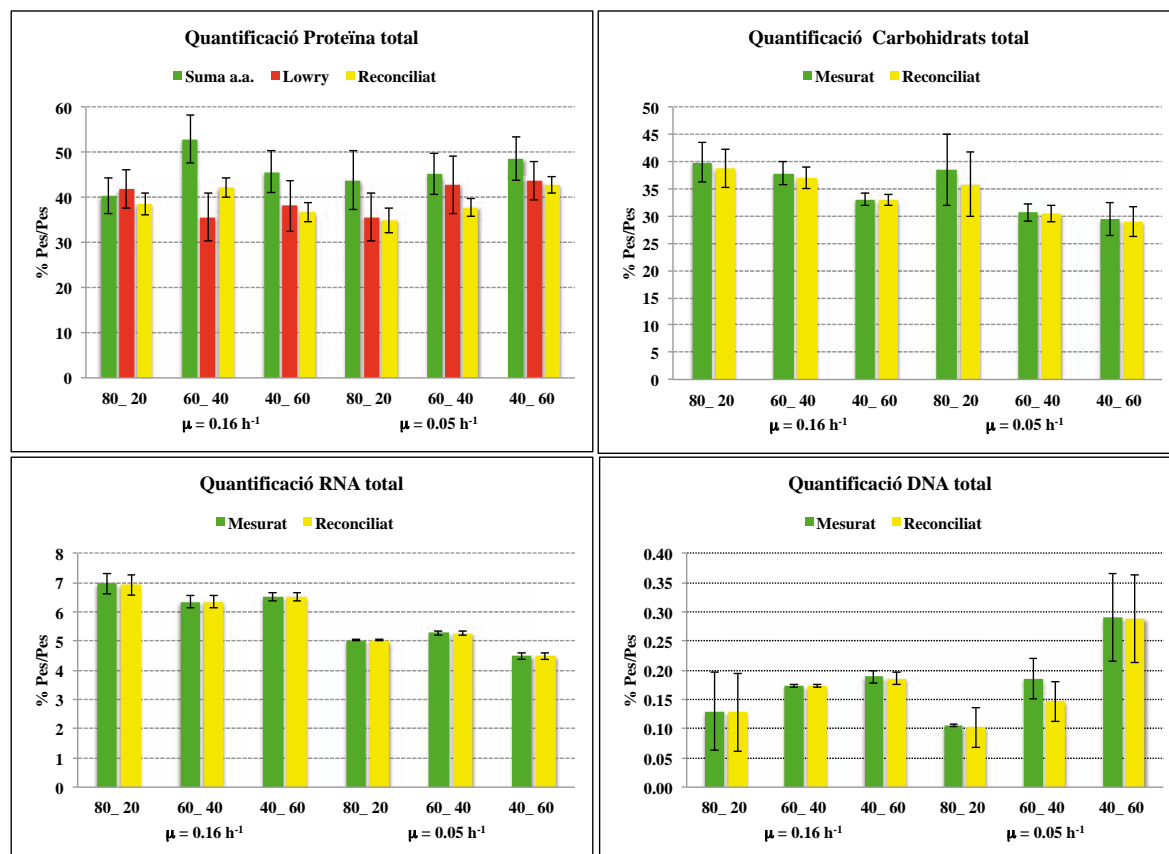


Figura 2.5. Resum de la composició macromolecular de la biomassa obtinguda pels experiments realitzats amb barreges glicerina/metanol. En cada una de les figures es representen les concentracions de les mescles utilitzades % Glicerina % Metanol i la velocitat de creixement utilitzada.

Contingut de carbohidrats total

En la Figura 2.3 i 2.5 (part superior dreta) es mostra el contingut total de carbohidrats en la cèl·lula per als diferents casos d'estudi. Respecte als experiments amb glucosa/metanol, en tots els casos es presenta un valor inferior que amb glucosa com a única font de carboni. Aquesta disminució del contingut de carbohidrats està estretament relacionada amb un valor superior del contingut de proteïna cel·lular, ja que tots dos components suposen més d'un 75% del contingut total present en la biomassa. Tanmateix, no s'observen diferències estadísticament significatives en els valors finals per les soques productores de proteïna recombinant.

D'altra banda, en els experiments realitzats amb mescules de glicerina/metanol s'observa una tendència decreixent del contingut de carbohidrats a mesura que el contingut de glicerina disminueix en totes dues velocitats de creixement.

Contingut de Lípid total

Respecte a la fracció de lípid en el contingut cel·lular, el valor utilitzat per als càlculs posteriors per la determinació dels fluxos intracel·lulars va ser estimada en el pas de reconciliació de dades, donat que els resultats obtinguts durant la seva determinació mostraren uns nivells molt reduïts amb un error molt elevat. Així doncs, com a valor inicial mesurat de la fracció de lípids continguda en la biomassa va ser utilitzat el descrit per glucosa com a única font de carboni [5]. La determinació del contingut total de lípid present en la biomassa es calcula per tots els experiments seguint la mateixa metodologia.

Composició elemental de la biomassa

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, intrínsecament la composició macromolecular de la biomassa està formada per diferents elements químics que d'igual forma han de ser considerats per la realització dels càlculs posteriors. Usualment, els elements que es consideren per la majoria de casos d'estudi, són els més abundants i la seva suma és aproximadament el 90% del pes sec cel·lular. Principalment, aquests elements són C,H,O,N,P i S. En aquest estudi solament es mesurà C,H,N,S i el contingut de cendres total (Apèndix 1.2) ja que el contingut de P en les mostres es situava per sota del límit de detecció de l'equip. Tanmateix, durant el pas de reconciliació fou determinat el contingut d'O₂, necessari per tancar el balanç global tenint en compte tota la informació disponible.

Anàlisi de consistència i reconciliació de dades

Com ja s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesi, a l'hora de calcular de la forma més acurada possible els valors de fluxos metabòlics, és necessari verificar la consistència de totes les dades obtingudes. En el moment que s'obtenen dades complementàries o en certs casos redundants, és necessària la utilització de tècniques de reconciliació per obtenir la millor estimació de les mesures per al sistema d'estudi. Aquest procediment precisa de dos blocs. En el primer, els diferents valors de la composició de biomassa obtinguts són utilitzats per obtenir la millor estimació de la composició de biomassa. En segon lloc, l'anàlisi de consistència dels substrats i productes, consumits i produïts juntament amb la fórmula de biomassa prèviament obtinguda, és realitza conjuntament.

El càlcul de la composició de biomassa reconciliada va ser calculat d'acord amb la metodologia descrita per Lange i Heijnen [13]. En resum, aquesta metodologia ens permet el càlcul de la millor estimació de la composició de biomassa resolent un sistema d'equacions lineals les quals tenen en consideració les lleis de conservació de components elementals al igual com la estricta

conservació del balanç de matèria. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que per el valor experimental obtingut s'ha de considerar també el pes proporcional de la confiança de cada anàlisi efectuat.

Així doncs, per a la realització del procediment de reconciliació, la composició elemental dels components macromoleculars en termes de C-mol, va ser calculada.

Taula 2.3. Composició de biomassa calculada després del procediment de reconciliació de dades. Composició macromolecular i de components elementals de les diferents soques d'estudi per al cas de barreges amb glucosa metanol.

	X33 Control		X33 ROL-1		X33 ROL-2	
	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Valor
Proteïnes	48.76	1.65	42.89	2.34	43.00	2.35
Carbohidrats	31.10	1.36	34.20	1.36	34.18	1.36
lípid s	1.50	2.37	4.26	2.59	5.32	2.60
RNA	6.94	0.69	6.85	0.70	6.85	0.70
DNA	0.14	0.01	0.14	0.01	0.14	0.01
SO₄	0.03	0.20	0.01	0.24	0.23	0.23
H₂O	5.07	1.92	5.24	1.91	3.87	1.89
Metalls	6.46	0.36	6.42	0.36	6.42	0.36
C	42.93	1.38	43.49	1.38	44.62	1.36
H	6.24	0.10	6.35	0.12	6.33	0.12
N	9.52	0.30	8.42	0.40	8.31	0.40
O	34.00	1.35	34.46	1.35	33.46	1.34
S	0.16	0.07	0.18	0.08	0.18	0.08
cenres	7.15	0.35	7.10	0.35	7.10	0.35

En les Taules 2.3 i 2.4 es pot observar la composició final reconciliada de la biomassa per totes les condicions de cultiu plantejades per aquest treball de tesi. El procediment de reconciliació ens ofereix la millor estimació de la composició de biomassa incloent el contingut de lípids o el valor d'oxigen que no han estat realment mesurats. La composició de biomassa obtinguda és consistent, tenint en compte que tots els components macromoleculars considerats sumen el 100 % de la biomassa, així com també els elements químics principals pels quals estan constituïts. Tanmateix, en aquestes taules estan reflectits els errors estàndards de cada mesura, els quals tenen un pes important a l'hora de realitzar qualsevol càlcul de fluxos posterior.

Observant la Taula 2.3, els valors de composició obtinguts ens mostren un augment en la composició de lípids, els quals tenen una grau de reducció més elevat que les proteïnes o els carbohidrats. El contingut proteic és menor en les soques productores, possiblement degut a la producció de proteïna recombinant, mentre que la quantitat de DNA i RNA roman constant per tots els casos. Ara bé, tenint en compte els errors obtinguts per les mesures de macrocomponents, serien necessaris experiments alternatius per confirmar aquestes tendències.

Pel que fa als resultats de composició obtinguts utilitzant mescleres de glicerina/metanol (Taula 2.5), s'observa una disminució en la composició lipídica en incrementar la velocitat de creixement, contrària als valors de carbohidrats obtinguts. Tanmateix, el valor del contingut proteic s'incrementa a mesura que la relació metanol/glicerina augmenta d'una forma gradual per ambdues velocitats d'alimentació.

Distribució de fluxos en *P. pastoris* mitjançant metodologia ^{13}C

Taula 2.4 Composició de biomassa calculada després del procediment de reconciliació de dades. Composició macromolecular i de components elementals de les diferents condicions d'estudi per al cas de barreges amb glicerina metanol.

	Experiments $\square = 0.16 \text{ h}^{-1}$				Experiments $\square = 0.05 \text{ h}^{-1}$							
	X-33 ROL_1		X-33 ROL_1		X-33 ROL_1		X-33 ROL_1		X-33 ROL_1		X-33 ROL_1	
	80% 20%		60% 40%		40% 60%		80% 20%		60% 40%		40% 60%	
	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd	% Pes/Pes	Sd
Proteïnes	38.53	2.36	42.13	2.12	36.77	1.89	34.94	2.80	37.77	1.91	42.72	1.85
Carbohidrats	38.78	3.49	37.10	2.02	32.97	1.09	35.89	6.01	30.43	1.56	29.05	1.56
lípids	1.58	4.26	1.92	3.09	5.68	2.82	8.77	5.57	6.50	2.89	7.30	3.19
RNA	6.93	0.35	6.35	0.21	6.52	0.15	5.04	0.03	5.28	0.09	4.49	0.11
DNA	0.13	0.07	0.17	0.00	0.19	0.11	0.10	0.35	0.15	0.35	0.29	0.07
SO₄	2.09	0.21	0.01	0.30	0.80	0.04	0.17	0.09	3.69	0.20	0.86	0.05
H₂O	2.07	3.74	4.26	2.70	7.46	2.54	2.89	4.91	9.15	2.57	6.32	2.81
Metalls	9.90	1.05	8.02	0.43	9.61	0.51	11.28	1.17	7.02	0.38	8.97	0.47
C	41.20	2.69	40.76	1.90	40.76	1.90	43.33	3.23	40.40	1.90	42.90	1.97
H	5.69	0.21	6.23	0.10	6.23	0.10	6.07	0.31	6.36	0.11	6.38	0.15
N	7.69	0.40	7.43	0.32	7.43	0.32	6.91	0.47	7.38	0.32	8.04	0.31
O	34.12	2.64	35.04	1.94	35.04	1.94	31.55	3.23	37.00	1.92	32.94	2.00
S	0.71	0.07	0.28	0.01	0.28	0.01	0.25	0.03	1.30	0.07	0.30	0.01
cendres	10.58	1.05	10.27	0.51	10.27	0.51	11.88	1.17	7.56	0.38	9.45	0.47

Taula 2.5 Fórmula de biomassa en C-mol calculada després del procediment de reconciliació. Composició elemental de la biomassa en termes de components elementals per les diferents soques d'estudi utilitzant com a font de C un substrat mixt format per glucosa/metanol.

Soques	Font de Carboni Glucosa / Metanol	Formula C-mol Biomassa	Relació C:N	Relació H:O	γ
X-33 control	80%_20% $\square = 0.09\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.687} \text{N}_{0.17} \text{O}_{0.635} \text{S}_{0.002}$	5.9	2.7	3.9
ROL -1	80%_20% $\square = 0.09 \text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.749} \text{N}_{0.141} \text{O}_{0.679} \text{S}_{0.002}$	7.1	2.6	4.0
ROL_2	80%_20% $\square = 0.09 \text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.702} \text{N}_{0.14} \text{O}_{0.643} \text{S}_{0.002}$	7.1	2,6	4.0
X-33 control*	100 % Glucosa $\square = 0.1 \text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.761} \text{N}_{0.143} \text{O}_{0.636} \text{S}_{0.0018}$	7.0	2.8	4.1
<i>S. cerevisiae</i> **	100 % Glucosa $\square = 0.1 \text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.748} \text{N}_{0.148} \text{O}_{0.596} \text{S}_{0.0018}$	6.8	2.9	4.2

* Valors extrets de [5]; **Valors extrets de [13]

Durant l'exercici de reconciliació de les dades experimentals, també s'obté el valor dels elements químics continguts en la biomassa inclosos els no mesurats, com és el cas de l'oxigen, valor del qual és extret per diferència del total mesurat respecte 100%. Aquest procediment ens permet calcular la fórmula elemental en C-mol per la biomassa, tal i com es presenta en les Taules 2.5 i 2.6. El resultat final de la fórmula de biomassa fou utilitzat per tots els càlculs posteriors durant aquets treball.

Taula 2.6. Fórmula de biomassa en C-mol calculada després del procediment de reconciliació. Composició elemental de la biomassa en termes de components elementals per les diferents condicions d'estudi utilitzant com a font de C barreges de glicerina/metanol amb diferents velocitats d'alimentació.

Font de Carboni Glicerina /Metanol	Formula C-mol Biomassa	Relació C:N	Relació H:O	γ
80%_20% $\square = 0.16\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.658} \text{N}_{0.140} \text{O}_{0.71} \text{S}_{0.006}$	7.1	2.3	3.81
60%_40% $\square = 0.16\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.787} \text{N}_{0.146} \text{O}_{0.701} \text{S}_{0.005}$	6.9	2.5	3.97
40%_60% $\square = 0.16\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.834} \text{N}_{0.137} \text{O}_{0.737} \text{S}_{0.003}$	7.3	2.5	3.96
80%_20% $\square = 0.05\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.682} \text{N}_{0.121} \text{O}_{0.624} \text{S}_{0.002}$	8.3	2.7	4.12
60%_40% $\square = 0.05\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.89} \text{N}_{0.137} \text{O}_{0.785} \text{S}_{0.012}$	7.3	2.4	3.98
40%_60% $\square = 0.05\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.784} \text{N}_{0.141} \text{O}_{0.658} \text{S}_{0.003}$	7.1	2.7	4.06
80% Glucose_20% Methanol $\square = 0.09\text{h}^{-1}$	$\text{C H}_{1.749} \text{N}_{0.141} \text{O}_{0.679} \text{S}_{0.002}$	7.1	2.6	4.05

Balanç màssic dels components d'entrada i sortida

Un dels punts principals en qualsevol estudi de distribució de fluxos és el fet de validar la mesura de tots els substrats consumits i productes generats durant l'experiment. Així doncs, és necessària una mesura adient dels gasos d'entrada i sortida del reactor per poder realitzar un balanç de tots els components adequat. Aquest pas va ser realitzat d'acord amb els procediments estadístics [22][23][24], els quals són molt similars als utilitzats anteriorment per la reconciliació

de la biomassa. En aquest cas, la fórmula de biomassa anteriorment calculada s'utilitza com a base per la reconciliació dels components macroscòpics. Finalment, l'índex de consistència 'h', que segueix una distribució χ^2 , es va determinar per tal de descartar la presència d'errors grans a les mesures o durant el procés de reconciliació, d'acord amb el procediment de càlcul establert [23][22]. En tots els casos es va descartar la presència d'errors grans de mesura i es va validar la consistència de dades. En aquest cas els valors reconciliats constitueixen el valor de les variables reals més probables, tenint en compte les mesures i la validesa del principi de balanç elemental i de matèria considerat durant el procés de reconciliació.

Taula 2.8. Substrats i productes mesurats en estat estacionari utilitzant diferents barreges de glicerina i metanol per ambdues velocitats d'alimentació. La fila inferior de la Taula correspon l'error en el balanç de C per a cada condició de cultiu.

mmol/g _{DCW} .h	Experiments $\mu = 0.05h^{-1}$						Experiments $\mu = 0.16h^{-1}$					
	80%_20%		60%_40%		40%_60%		80%_20%		60%_40%		40%_60%	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
Glicerina	-0.86	0.06	-0.73	0.05	-0.56	0.04	-2.69	0.35	-2.81	0.70	-2.28	0.46
Metanol	-0.59	0.07	-1.47	0.07	-2.41	0.07	-0.19	0.03	-1.82	0.27	-2.75	0.55
OUR	-2.80	0.28	-3.00	0.30	-3.50	0.35	-3.80	0.38	-4.40	0.67	-5.30	0.53
CER	1.60	0.16	2.00	0.20	2.20	0.22	3.50	0.17	3.80	0.57	3.40	0.17
Biomassa	1.80	0.13	1.69	0.12	1.79	0.13	5.24	0.89	5.65	0.28	5.54	0.83
% error de C	6.34		0.16		3.28		5.47		-7.52		6.96	

Tabla 2.9. Substrats i productes mesurats en estat estacionari utilitzant diferents soques sota condicions de creixement amb glucosa /metanol com a font de carboni.

mmol/ gDCW*h	Experiments $\mu = 0.09h^{-1}$					
	X-33 Control		X-33 ROL_1		X-33 ROL_2	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
Glucosa	-0.80	0.06	-0.92	0.06	-0.94	0.05
Metanol	-1.17	0.08	-1.30	0.07	-1.27	0.06
OUR	-2.88	0.29	-3.80	0.38	-3.30	0.33
CER	2.23	0.22	2.77	0.28	2.88	0.29
Biomassa	3.28	0.23	3.17	0.22	3.25	0.16
% error Balanç C	14.2		11.2		6.3	

Tal i com s'observa en les Taules 2.8 i 2.9, per les dues mesclades de substrats diferents es comptabilitza la majoria de carboni per les diferents condicions de cultiu. Tot i que en el cas amb

el substrat mixt glucosa/metanol com a font de carboni i utilitzant la soca control, l'error supera el 10%, possiblement per una quantificació poc acurada del cabal de sortida del reactor.

Un cop obtingudes totes les dades de cadascuna de les condicions experimentals, el pas de reconciliació estadística va ser realitzat, obtenint un índex de consistència per sota de 7.81 (valor límit de la distribució χ^2) amb un 95% de confiança amb 3 graus de redundància per tots els casos. En les Figures 2.6 i 2.7 es mostren els valors finals obtinguts, els quals seran utilitzats per al càlcul de distribucions de fluxos en els capítols posteriors.

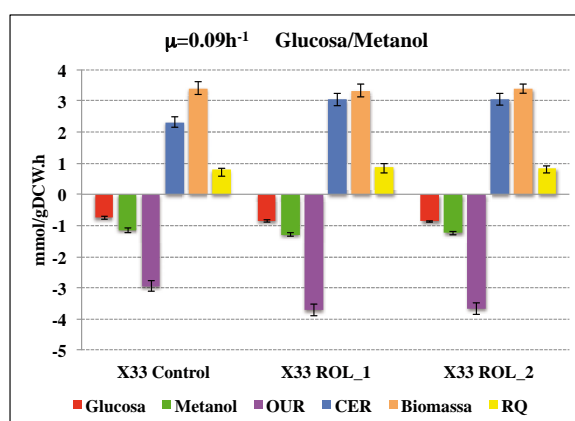


Figura 2.6 Substrats consumits i metabòlits generats per a les diferents condicions experimentals amb el substrat mixt glucosa/metanol.

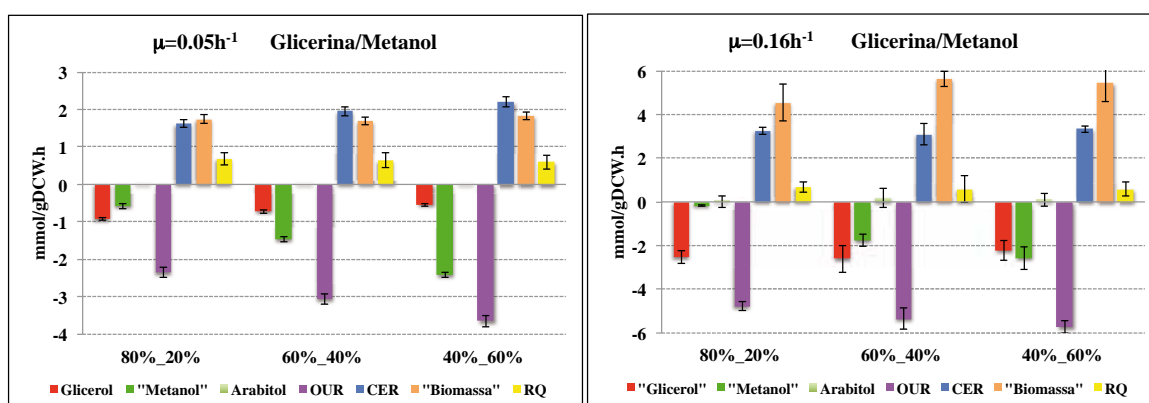


Figura 2.7. substrats consumits i metabòlits generats per a les diferents condicions experimentals amb barreges glicerina/metanol.

Conclusions

Durant aquest estudi, diferents mètodes experimentals han estat aplicats per tal d'obtenir el major nombre de dades amb la finalitat de poder determinar la composició elemental i macromolecular de la biomassa. A causa de la varietat de soques utilitzades durant aquest treball i les diferents condicions experimentals proposades, es proposa realitzar una quantificació detallada de la biomassa per a cada condició de cultiu i per a cada soca utilitzada. Aquestes composicions es faran servir posteriorment per calcular el consum de precursors del metabolisme que s'ha de tenir en compte durant el càlcul de fluxos metabòlics. Com a resultat de l'estudi es

varen formular diferents composicions fins al moment inexistents per als casos on s'utilitzen substrats mixtes com a font de carboni.

Apèndix

1.1 Elements químics mesurats a la biomassa per a les diferents condicions experimentals utilitzant mescla única de glucosa/metanol com a font de carboni. Tots els valors representats es troben en % de biomassa seca.

Glucosa _ Metanol $\mu= 0.09 \text{ h}^{-1}$			
	X33 Control	X33 ROL-1	X33 ROL-2
C	43.58 ± 2.18	43.35 ± 2.17	44.34 ± 2.22
H	6.32 ± 0.32	7.01 ± 0.35	7.001 ± 0.35
N	8.40 ± 1.26	8.02 ± 1.20	8.08 ± 1.21
O	34.38 ± 1.72	34.27 ± 1.71	33.2 ± 1.66
S	0.17 ± 0.07	0.2 ± 0.08	0.195 ± 0.08
Cendres	7.2 ± 0.36	7.2 ± 0.36	7.17 ± 0.36

1.2 Elements químics mesurats a la biomassa per a les diferents condicions experimentals utilitzant diferents mescles de glicerina/metanol com a font de carboni. Tots els valors representats es troben en % de biomassa seca.

	Glicerol _ metanol $\mu= 0.16 \text{ h}^{-1}$			Glicerol _ metanol $\mu= 0.05 \text{ h}^{-1}$		
	80%_20%	60%_40%	40%_60%	80%_20%	60%_40%	40%_60%
C	41.11 ± 4.11	42.36 ± 2.12	40.8 ± 2.04	43.3 ± 4.32	40.45 ± 2.02	42.96 ± 2.15
H	6.47 ± 0.65	6.51 ± 0.33	6.47 ± 0.32	6.65 ± 0.67	6.61 ± 0.33	6.47 ± 0.32
N	7.02 ± 0.7	8.48 ± 0.42	7.31 ± 0.37	6.46 ± 0.65	7.23 ± 0.36	7.79 ± 0.39
O	33.89 ± 3.39	33.93 ± 5.1	34.81 ± 5.22	31.27 ± 4.69	36.82 ± 5.52	33.02 ± 4.95
S	0.72 ± 0.07	0.1 ± 0.1	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.03	1.31 ± 0.07	0.3 ± 0.02
Cendres	10.8 ± 1.08	8.7 ± 0.44	10.3 ± 0.52	12.1 ± 1.21	7.6 ± 0.38	9.5 ± 0.47

1.3 Fórmules en C-mols calculades per a cada component de la biomassa durant les diferents condicions experimentals.

	X33 Control 80% Glucosa _ 20% Metanol					
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.59	0.281	0.338	0.002	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.63	0	0.130	0	0.0019
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

	X33 ROL-1 80% Glucosa _ 20% Metanol					
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.577	0.277	0.336	0.003	0
Carbo.	1	1.666	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.610	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.230	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.250	0.378	0.613	0	0.1021

X33 ROL-2 80% Glucosa _ 20% Metanol						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.570	0.27	0.331	0.0023	0
Carbo.	1	1.666	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.610	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.230	0.4	0.734	0	0.104
DNA	1	1.255	0.378	0.613	0	0.102

X33 Control 80% Glicerol _ 20% Metanol $\mu=0.16h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.570	0.27	0.330	0.002	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

X33 Control 80% Glicerol _ 20% Metanol $\mu=0.05h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.565	0.27	0.334	0.004	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

X33 Control 60% Glicerol _ 40% Metanol $\mu=0.16h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.57	0.279	0.341	0.002	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

X33 Control 60% Glicerol _ 40% Metanol $\mu=0.05h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.56	0.289	0.330	0.001	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

X33 Control 40% Glicerol _ 60% Metanol $\mu=0.16h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.57	0.281	0.338	0.002	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

X33 Control 40% Glicerol _ 60% Metanol $\mu=0.05h^{-1}$						
	C	H	N	O	S	P
Prot.	1	1.56	0.275	0.332	0.002	0
Carbo.	1	1.66	0	0.833	0	0
Lipids	1	1.61	0.001	0.100	0	0.001
RNA	1	1.23	0.4	0.734	0	0.1047
DNA	1	1.26	0.378	0.613	0	0.1021

Bibliografia

1. Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J: **Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network.** *Genome Research* 2003, **13**:244–53.
2. Feist AM, Palsson BØ: **The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*.** *Nature Biotechnology* 2008, **26**:659–67.
3. Nookaew I, Jewett MC, Meechai A, Thammarongtham C, Laoteng K, Cheevadhanarak S, Nielsen J, Bhumiratana S: **The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**:71.
4. Feist A, Herrgård M, Thiele I: **Reconstruction of biochemical networks in microorganisms.** *Nature Reviews. Microbiology* 2008, **7**:129–143.
5. Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P, Albiol J: **Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:65.
6. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2001, **86**:59–70.
7. Cregg JM: **DNA-Mediated Transformation.** *Methods in Molecular Biology* 2007, **389**:27–42.
8. Serrano A, Cereghino G, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of its gene.** In *Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology.* edited by Merten O-W Kluwer Academic; 2001:259–267.
9. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures.** *Journal of Biotechnology* 2005, **116**:321–335.
10. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D: **Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins.** *Biotechnology and Bioengineering* 2008, **100**:177–83.
11. Moore S, Spackman DH, Stein WH: **Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.** *Federation proceedings* 1958, **17**:1107–15.
12. Herbert D, Phipps P, Stange R: **Chemical analysis of microbial cells.pdf.** *Methods in Microbiology* 1971, **5b**:209–344.
13. Lange HC, Heijnen JJ: **Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **75**:334–344.
14. Hara a, Radin NS: **Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent.** *Analytical biochemistry* 1978, **90**:420–6.
15. De Mey M, Lequeux G, Maertens J, De Maeseneire S, Soetaert W, Vandamme E: **Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms.** *Analytical biochemistry* 2006, **353**:198–203.

16. Benthin S, Nielsen J, Villadsen J: **A simple and reliable method for the determination of cellular RNA content.pdf.** *Biotechnology Techniques* 1991, **5**:39–42.
17. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680–5.
18. Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen J: *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies.* First edit. 1998.
19. Schutter K De, Lin Y, Tiels P, Hecke A Van, Glinka S, Peer Y Van De, Callewaert N, Weberlehmann J, Rouze P: **Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*.** *Nature Biotechnology* 2009, **27**:561–566.
20. Mattanovich D, Graf AB, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F, Gasser B: **Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:29.
21. Resina D, Bollok M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P: **Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:21.
22. Heijden V Der, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KC: **Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I. Classification of the Calculability and the Balanceability of Conversion Rates.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**:3–10.
23. Heijden RTJM Van Der, Hellinga BRHC: **Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: II . Diagnosis and Estimation of Gross Errors.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**.
24. Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J: **Review of cellular metabolism.** In *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies.* 1998, **16**:22–76.

Capítol 3. Distribució de fluxos en *P. pastoris* mitjançant metodologia ¹³C



Introducció

En els darrers anys el llevat metilotròfic *P. pastoris* ha esdevingut un atractiu sistema d'expressió de proteïnes recombinants [1][2][3]. A més a més, els darrers desenvolupaments de diferents eines de treball específiques per l'estudi de sistemes biològics [4][5][6] han obert tot un nou món d'oportunitats per a la millora de diferents soques i l'optimització de diferents condicions de cultiu.

Diferents estudis en llevats, portats a terme sota diferents condicions de cultiu com per exemple la velocitat de creixement o diferents substrats entre d'altres[7][8], han descrit l'impacte de la sobre expressió de proteïnes recombinants suggerint un impacte en el metabolisme central de les cèl·lules. En tot cas, pel que fa al nombre d'estudis quantitativs en aquest llevat que han descrit el potencial efecte entre el metabolisme central, les condicions ambientals de treball i la producció de proteïnes recombinants és encara avui dia es bastant limitat [9][10][11].

El promotor de l'alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris* ha estat extensament utilitzat per la producció de proteïnes recombinants. Les bases generals d'aquest sistema d'expressió rau en el fet de que els enzims necessaris per metabolitzar el metanol solament és sintetitzen quant les cèl·lules son alimentades amb aquest substrat [12]. Tanmateix la repressió catabòlica per diferents substrats multi carbonats és particularment estreta en *P. pastoris*. Interessant-ment, estratègies de cultiu utilitzant mescles de substrats multi carbonats amb metanol, com ara sorbitol (C₆) o glicerina (C₃) han potenciat la producció de proteïna en nivells significatius, suggerint que la carga metabòlica ocasionada per la expressió de proteïna recombinant pot ser reduïda [13].

En aquest capítol 'marcatge Fraccional Biosintèticament Dirigit' (BDF) amb ¹³C fou utilitzat per estudiar l'efecte de la carga proteica en el metabolisme central de *P. pastoris*. Específicament, aquest treball es centra en la comparació entre diferents soques del llevat en qüestió, amb diferents quantitats del gen ROL integrat. Així doncs, i amb aquesta idea com a base, s'analitzarà d'una manera quantitativa el potencial impacte de la secreció d'una proteïna recombinant en el metabolisme central i energètic del llevat *P. pastoris*.

Materials i mètodes

Soques

La soca *P.pastoris* X-33 (invitrogen) amb pGAP α com a vector simulat, fou escollida com a soca control en aquest estudi. Com a soques productores de proteïna recombinant, s'escollí la soca X-33 pPICZA α -ROL (Rol_1) prèviament obtinguda [14], considerada com a sistema d'expressió amb una única copia del gen ROL d'expressió, i una segona soca generada per aquest estudi seguint una segona transformació de la soca prèviament comentada en el capítol 2 amb la incorporació d'un segon gen d'expressió (Rol_2). Totes dues soques foren analitzades amb una tècnica de qRT-PCR amb la finalitat de quantificar el nombre exacte de còpies inserides en el genoma.

Condicions de cultiu

Duplicats biològics amb condicions aeròbiques, utilitzant un flux constant d'aliment i mantenint una concentració de carboni limitant a l'interior del reactor, és varen portar a terme per a cada una de les soques d'estudi. S'utilitzà un reactor de 3L de volum total (*Applikon Biotechnology*) amb un volum de treball de 1.0 L controlat a 25° de temperatura. El pH fou mantingut a 5.0 mitjançant l'addició d'una dissolució 1M de NH_3 . Una taxa d'aeració 1 litre d'aire cada minut, controlada per els cabalímetres màssics del propi reactor és mantingué durant tot el procés. Un valor fixat de 800 rpm fou necessària per a mantenir una consigna d'oxigen dissolt mínima del 15%. Una sobrepressió de 0.2 bars fou aplicada al sistema per tal de facilitar la presa de mostra en el reactor. El flux d'aliment cap a l'interior del reactor fou fixat a una $\dot{V}= 0.09\text{h}^{-1}$ alimentant un medi definit [15] amb 50g L^{-1} d'una barreja de glucosa/metanol (80% glucosa, 20% metanol, p/p) com a font de carboni. Tots els gasos del bioreactor foren refredats amb un condensador a 4°C, assecats amb dues columnes de sílica gel i posteriorment analitzats mitjançant sensors BCP- CO_2 i BCP- O_2 (Blue-Sens). Tots els sensors utilitzats foren prèviament calibrats d'acord amb les condicions d'operació fixades per la realització dels experiments i amb la utilització de diferents bales de calibració de composició coneguda. Diferents mostres durant l'estat estacionari foren avaluades per tal de corroborar una constant producció de biomassa, de CER un consum d'oxigen i de tots els possibles metabòlits extracel·lulars detectables.

Procediments analítics

Tots els procediments analítics per la determinació de la composició de biomassa i la concentració de metabòlits extracel·lulars foren realitzats tal i com s'explica en el capítol 2 Anàlisi de Biomassa.

Tant mateix, durant aquest estudi i per corroborar una de les hipòtesis plantejades per la formulació de les diferents equacions de distribució de fluxos, es va realitzar un anàlisi d'activitat enzimàtica per quantificar l'activitat de l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PepCK). Aquesta determinació enzimàtica fou realitzada d'acord amb el protocol descrit prèviament a [16], utilitzant una fracció soluble d'extracte cel·lular obtingut després d'una disrupció mecànica mitjançant boles de vidre [17]. Breument, l'extracte cel·lular fou preparat mitjançant una disrupció mecànica d'uns 15-20 mg de cèl·lules liofilitzades re suspeses en 0.5 mL amb una solució tamponada a (20 mM Hepes, pH 7.1, 1 mM DTT, 100 mM KCl), inhibidor de proteases 'Complete cocktail' (Roche) amb 1 g de boles de vidre. Seguidament la suspensió cel·lular fou mesclada amb 6 períodes de 30 s amb un interval de 30 s de repòs amb gel entre cada etapa. Les mostres foren centrifugades a 3000 G durant 5 min. a 4°C i transferides en tubs 'ependorf' per una posterior etapa de centrifugació a 5000 G per tal d'assegurar la completa precipitació i comprovar que la mostra fos totalment transparent. El sobrenedant de les etapes de centrifugació fou usat com a extracte lliure cel·lular. L'activitat de la PepCK fou determinada seguint la corba d'absorbància a 340 nm del cofactor nucleòtid piridina reduït ($E_{340}=6.22\text{nM}^{-1}$). La mescla de reacció (1 mL) contenint 100 μmol de tampó Imidazole-HCl a pH 6.6, 50 μmol NaHCO_3 , 2 μmol MnCl_2 , 2 μmol de glutatona reduïda, 2.5 μmol ADP, 0.15 μmol NADH, 3 U de malat deshidrogenasa (Roche) i entre 10-15 ml d'extracte lliure. Finalment la reacció fou engegada amb l'addició de 2.5 μmol de Pep. La corba d'activitat enzimàtica fou mesurada amb

un espectrofotòmetre (Varian Cary 300) a 30°C i 340 nm. És va definir una unitat d'activitat com la quantitat d'enzim que catalitza la formació de 1 μ mol de piridina reduïda per minut.

Marcatge Fraccional Biosintèticament Dirigit amb ^{13}C

Les cèl·lules de *P.pastoris* foren alimentades d'una forma continuada mitjançant una composició de carboni no marcada durant més de 5 temps de residència fins assolir un estat metabòlic estacionari, indicat per una densitat cel·lular i unes concentracions d'oxigen i diòxid de carboni estables a la sortida del reactor. El marcatge fraccional dirigit utilitzant dues fonts de carboni fou desenvolupat de la forma proposada per Aina Sola [18]. Breument, tenint en compte la utilització d'un medi amb dues fonts de carboni simultànies, durant el marcatge BDF s'utilitza el 12% (pes/pes) de font de carboni uniformement marcada ^{13}C amb un 88% (pes/pes) de font de carboni no marcada ^{12}C . La puresa de la font de carboni ^{13}C utilitzada fou del 99%, subministrada per Cortecnet (Voisins le Bretonneux, France). El substrat marcat fou alimentat al reactor durant un període de 1.5 temps de residència. Finalment, 500 ml del brou de cultiu foren recollits, centrifugats a 4000 G durant 10 min, re suspesos amb 20 mM d'una solució Tris-HCl a pH 7.6 amb una altra etapa final de centrifugació. La biomassa final obtinguda fou liofilitzada durant 24 hores (Benchtop 5L Vitris Sentry, Virtis Co., Gardiner, NY, USA). Finalment, 100 mg del liofilitzat cel·lular fou re suspès amb 10 mL d'una dissolució 6M HCl i seguidament hidrolitzat amb tubs de vidre cellats a 110°C durant unes 22 h. Aquesta suspensió resultant fou assecada durant la nit mitjançant un forn a 90°C re dissolt amb aigua i filtrat mitjançant filtres de 0.2 μm (Millipore). El filtrat resultant fou liofilitzat i re dissolt amb D_2O per la seva posterior injecció a l'espectrofotòmetre. El pH resultant de les mostres fou inferior a 1 degut al HCl residual.

Espectroscòpia NMR

L'anàlisi de l'espectre de ressonància magnètica nuclear (NMR) ^1H - ^{13}C -HSQC fou realitzat a 40°C utilitzant un espectrofotòmetre Varian Inova operant a una freqüència de ^1H - ressonància de 600 MHz de la forma descrita en la bibliografia [19]. Per a cada una de les mostres dos espectres diferents foren analitzats, observant les regions alifàtiques i aromàtiques. El resultat de l'espectre fou processat utilitzant un software Varian espectròmetre software 'VNMR' (versió 6.1,C).

Anàlisi basat en la relació entre fluxos metabòlics (METAFor)

El programa de càlcul FCAL (R.W. Glaser; FCAL 2.3.1) [20] fou utilitzat per la integració dels pics mesurats degut a l'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C dels carbonis provinents d'aminoàcids proteics a partir de les senyals ^1H - ^{13}C -HSQC NMR, i també per calcular l'abundància de fragments de carboni intactes originaris d'una simple molècula de glucosa. La nomenclatura utilitzada en aquest treball s'ha descrit l'extensament al capítol 1 d'introducció i descrita en [21].

Breument, $f^{(1)}$ representa la fracció de molècules on el carboni observat i els carbonis veïns provenen d'una molècula font de carboni diferent (glucosa o metanol), $f^{(2)}$ representa la fracció

de molècules on l'àtom de carboni observat i un dels seus veïns provenen de la mateixa molècula font de carboni, finalment $f^{(3)}$ representa la fracció de molècules en la qual l'àtom de carboni observat i els dos carbonis veïns provenen de la mateixa molècula de glucosa. En el cas de que el carboni observat tingui una constant d'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C significativament diferent per a cadascun dels dos carbonis veïns, llavors dues fraccions diferents poden ser avaluades, $f^{(2)}$ i $f^{(2*)}$. Amb aquesta premissa, la fracció de molècules amb un enllaç conservat entre el carboni observat i un del seus veïns amb la constant d'acoblament menor es representat per $f^{(2)}$. Alternativament, $f^{(2*)}$ és aquella on la constant d'acoblament entre el carboni observat i un dels seus veïns és major. Finalment si el carboni observat esta situat al final de la cadena carbonada solament existeix la possibilitat d'observar fragmentòmers $f^{(1)}$ o $f^{(2)}$.

Així dons tota la informació de marcatge mesurada als aminoàcids proteics pot ser extrapolada als seus precursors metabòlics, majoritàriament intermediaris del metabolisme central. Les cadenes principals de carboni de tots aquests intermediaris son conservades a través de les diferents rutes de síntesis dels aminoàcids corresponents[22].

Equacions de distribució de fluxos

Un cop realitzada la integració de les dades de tots els aminoàcids per a cadascuna de les mostres de fermentació, es varen obtenir els valors dels diferents fragmentòmers. Posteriorment es va comprovar la consistència dels resultats i la validesa de les rutes de síntesi es va procedir al càlcul de quocient de fluxos metabòlics necessaris per eliminar tots els possibles graus de llibertat de la xarxa metabòlica plantejada (Apèndix 1).

La compartimentalització de la xarxa metabòlica considerada per a l'anàlisi METAFoR fou la descrita anteriorment per *P.pastoris* amb la utilització de glucosa com a font de carboni [22]. Degut a la assimilació concurrent de dues fonts de carboni, la metodologia

de càlcul de distribució de fluxos per cèl·lules eucariotes descrita per Maaheimo fou estesa. La fracció de fosfoenolpiruvat (Pep) originada a partir de l'activitat de l'enzim fosfoenol piruvat carboxiquinassa fou assumit negligible, en base a que aquest enzim no esta involucrat en la assimilació de metanol [12] a més a més de no mostrar activitat amb la prova enzimàtica, descrita anteriorment, sota les condicions experimentals proposades en aquest estudi. Conseqüentment, la fracció de Pep fou considerada provinent de tres fonts diferents, tal i com es mostra en la Figura 1.

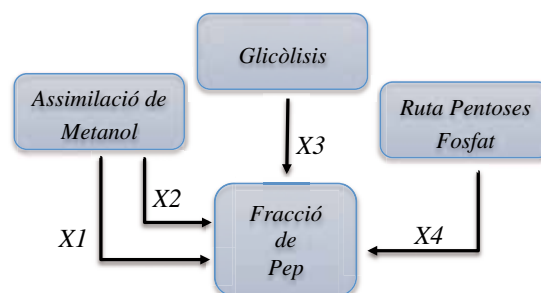


Figura 1. Contribució de les diferents vies metabòliques a la formació de Pep

Es va tenir en compte la contribució directa de les Pentoses fosfat (PPP), la ruta de la glicòlisis i finalment la via d'assimilació de metanol. No és va considerar cap més via metabòlica alternativa de contribució a la formació de Pep. Així doncs, es formula un balanç de matèria en el pool de Pep tenint en compte totes les aportacions de carboni possible (Eq.1).

$$X1 + X2 + X3 + X4 = Pep \qquad Eq.1$$

On X1 i X2 denoten el flux relatiu de carboni procedent dels pools de gliceraldehid fosfat (GA3P_{per}) i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) al pool de Pep, respectivament ambdós fluxos deriven de la directa assimilació de metanol. X3 representa el flux relatiu a través de la via de la glicòlisis, mentre que X4 representa el flux relatiu de contribució de la via de les pentoses fosfat al pool de Pep.

Tenint en compte que la via de la glicòlisis produeix sempre fragments intactes de carboni al pool de Pep [19] contràriament a la contribució de les altres vies metabòliques a aquest pool, es planteja un balanç de carboni en el C2 del Pep per tal d'intentar resoldre les incògnites plantejades en la Eq.1. A més a més, les molècules de Pep procedents de la via d'assimilació de metanol presenten un patró de marcatge diferent d'aquelles molècules de Pep procedents de la via de les PPP. La contribució de les PPP resulta en la interconverció de tres molècules de pentoses fosfat en cinc molècules de Pep. Entre aquestes cinc molècules originades, a les 3/5 parts hi romanen els fragments C3-C4-C5 intactes mentre que les altres 2/5 parts conserven l'enllaç C1-C2 intacte i és forma un nou enllaç provinent d'una altra molècula [19]. D'altra banda, la ruta d'assimilació de metanol, contribueix al pool de Pep amb el mateix fragment marcat que la via de les PPP però amb la possibilitat de revertir el fragment de C3-C4-C5 provinent d'aquesta via degut a la isomerització del DHAP, el qual pot revertir la orientació d'aquest fragment. El metanol es assimilat per la formació d'una molècula de sis carbonis la qual és posteriorment separada amb dos fragments de tres carbonis respectivament, GAP i DHAP. El GAP reacciona simètricament a la formació de Pep mentre que les molècules de Pep formades per el DHAP mostren diferents patrons de marcatge d'aquelles fraccions originades a través de la via de les PPP, degut a la isomerització comentada anteriorment. En la Figura 2. es mostren les diferents possibilitats de patrons de marcatge dels fragments de molècules de Pep originades per les tres vies de formació observant que el carboni central, que serà el C2 en el pool de Pep, sempre sigui ¹³C. S'ha de tenir en compte que la fracció de Pep originada mitjançant les diferents vies de síntesis fou derivada de la formulació d'un balanç màssic en el C2 del Pep, observant els fragmentòmers $f^{(2)}$ i $f^{(2*)}$.

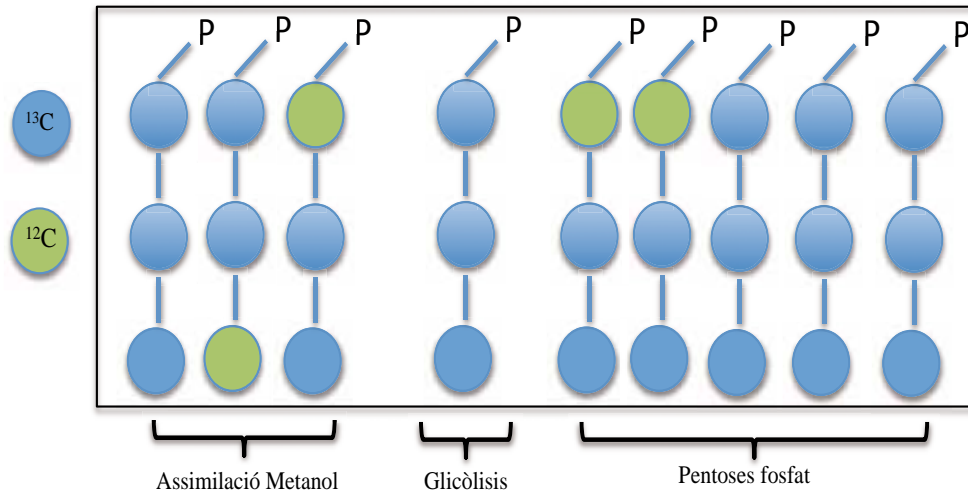


Figura 2. Fragments considerats per la formulació del balanç de matèria al C2 del Pep.

Per tant, tenint en compte la contribució de les diferents vies metabòliques i la informació obtinguda a partir dels aminoàcids sintetitzats directament a partir de Pep (Phe-C α i Tyr-C α), es formularen diferents balanços de matèria mitjançant el mapa de transicions de carboni descrit per ARM [23] per els fragmentòmers $f^{(2)}$ i $f^{(2*)}$ dels aminoàcids Phe-C α i Tyr-C α .

$$f^{(2)}\{\text{Phe, Tyr } C\alpha\} = X1 \cdot f^{(2)}\{\text{His } C\delta\} \cdot 0.5 + X2 \cdot f^{(2*)}\{\text{His } C\alpha\} + X4 \cdot \left(\frac{2}{5} \cdot f^{(2)}\{\text{His } C\delta\} + \frac{3}{5} \cdot f^{(2*)}\{\text{His } C\alpha\} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

$$f^{(2*)}\{\text{Phe, Tyr } C\alpha\} = X1 \cdot f^{(2)}\{\text{His } C\delta\} \cdot 0.5 + X2 \cdot f^{(2)}\{\text{His } C\alpha\} + X4 \cdot \left(\frac{3}{5} \cdot f^{(2*)}\{\text{His } C\alpha\} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

Tenint en compte les equacions 1, 2 i 3, es poden formular les diferents contribucions de cada una de les rutes metabòliques a la síntesis de Pep. La contribució del flux X1, representada en les equacions 2 i 3 com $f^{(2)}\{\text{His} - C\delta\} \cdot 0.5$, sempre serà igual independentment del que decidim observar en el pool de Pep ja que, al tenir origen en un carboni terminal, solament existeix la possibilitat de $f^{(2)}$. Pel que fa a la contribució del flux X2 serà $f^{(2*)}\{\text{His} - C\alpha\}$ o $f^{(2)}\{\text{His} - C\alpha\}$ depenent del fragment que estem observant en el pool de Pep segons el mapa de transicions de carboni anteriorment comentat. La contribució del flux X3 es menyspreable, ja que la via de la glucòlisis no aporta cap fragment $f^{(2)}$ o $f^{(2*)}$ al pool de Pep. Finalment el flux X4 es el més complicat ja que s'han de tenir en compte tots els possibles trencaments dels diferents fragments de pentoses a l'hora de formar trioses. Es pot definir que si observem la formació de fragmentòmers $f^{(2)}$ en el Pep aquests son originaris de la suma de $\left(\frac{2}{5} \cdot f^{(2)}\{\text{His} - C\delta\} + \frac{3}{5} \cdot f^{(2*)}\{\text{His} - C\alpha\} \right)$ mentre que si el que estem observant és la formació de fragmentòmers $f^{(2*)}$ en el Pep, aquest son originats per $\frac{3}{5} \cdot f^{(2*)}\{\text{His} - C\alpha\}$. Finalment, tenint en compte aquesta peculiaritat, poden ser formulades les equacions per calcular les diferents contribucions. XPep_Met és el flux relatiu de la via d'assimilació de metanol la qual és la suma de X1 i X2 ja que forçosament aquest dos fluxos han de tenir el mateix valor numèric, mentre que XPep_PPP', és el flux relatiu provinent de les pentoses fosfat ja esmentat, les equacions 4 i 5 mostren les diferents contribucions formulades.

$$XPep_Met = \frac{f^{(2)}\{Phe,Tyr-C\alpha\} - X1 \cdot \left(\frac{2}{5} f^{(2)}\{His-C\delta\} + \frac{3}{5} f^{(2)}\{His-C\alpha\} \right)}{f^{(2)}\{His-C\delta\} \cdot 0.5 + f^{(2)}\{His-C\alpha\}} \quad \text{Eq.4}$$

$$XPep_PPP = \frac{f^{(2)}\{Phe,Tyr-C\alpha\} - X1 \cdot \{His-C\delta\} \cdot 0.5 + f^{(2)}\{His-C\delta\}}{\frac{2}{5} f^{(2)}\{His-C\alpha\}} \quad \text{Eq.5}$$

Un cop descrites les equacions, les quals ens permeten calcular el flux de carboni de les diferents vies metabòliques al pool de Pep, (seguint la metodologia de rastreig dels patrons de marcatge obtinguts amb els aminoàcids proteics als seus precursors metabòlics principals), es formula la fracció d'oxalacetat mitocondrial (Oaa_{mit}) originat a partir del piruvat citosòlic (Pyr_{cit}) mitjançant l'enzim de la piruvat quinasa. Aquesta distribució denominada XOaa_{Pyr}, fou derivada de l'aplicació del balanç de matèria als fragments de carboni C2-C3 de l'oxalacetat. Les molècules d'Oaa originades al cicle del TCA, contenen el fragment C2-C3 totalment trencat, o sigui que no provenen de la mateixa molècula inicial. Donat que el flux procedent del Pep cap a Pyr_{cit} es conegut com un via unidireccional, sota les condicions de carboni limitants utilitzades en aquest estudi, els fragments dels aminoàcids Phe-C α i Tyr-C α foren usats per representar l'estat de marcatge del Pyr_{cit}. Tenint en compte que el Oaa és el metabòlit precursor per la síntesis d'Asp o Thr i que l'esquelet carbonat de l'Oaa_{mit} és especialment conservat durant tot el cicle del TCA i per tant pot ser observat el seu patró de marcatge en el Glu. S'escolliren aquest tres aminoàcids per poder extreure la contribució d'aquesta branca a la distribució de fluxos total (Eq. 6). Així dons, s'utilitzaren els fragments de l'Asp-C α i Thr-C α per representar el patró de marcatge del C2 de l'Oaa_{mit}.

$$XOaaPyr = \frac{(f^{(2)} + f^{(3)}) \cdot \{Asp,Thr-C\alpha\}}{(f^{(2)} + f^{(3)}) \cdot \{Phe,Tyr-C\alpha\}} \quad \text{Eq.6}$$

Tal i com s'ha descrit anteriorment a la literatura [24][20], el càlcul de la relació de fluxos metabòlics utilitzant marcatge ¹³C fraccional d'aminoàcids rau en el fet d'assumir, per a tots els casos, un estat estacionari metabòlic i isotopomèric. D'aquesta forma ens assegurem que les dades obtingudes son constants durant el transcurs de l'experiment de marcatge.

Anàlisi de la distribució de flux metabòlic amb metodologia ¹³C

L'anàlisi de fluxos metabòlics amb restriccions de ¹³C (¹³C-MFA) fou aplicat d'acord amb un model estequiomètric assumint les principals vies del metabolisme central de *P. pastoris*. Per tal de calcular el fluxos nets intracel·lulars, el model fou restringit per paràmetres de flux extracel·lular (producció de biomassa, consum dels substrats addicionats i producció de CO₂) i les tres relacions de flux anteriorment comentades derivades de l'anàlisi METAFoR (veure Taula 5 Apèndix 2) de la mateixa forma descrita per Fischer [25], constituint així un sistema determinat d'equacions. En la construcció d'aquest model no es varen tenir en compte els cofactors redox com a restricció per solucionar el sistema ¹³C MFA plantejat. La utilització de cofactors per solucionar el balanç màssic és una possible font d'error a tenir en compte ja que

requereix d'un coneixement molt precís de l'activitat dels diferents isoenzims i enzims que fans servir els diferents tipus de cofactor, presents a tot el conjunt cel·lular.

La minimització de l'error quadràtic per el càlcul de fluxos a la xarxa metabòlica proposada per aquest estudi, fou realitzat d'acord amb el mètode descrit prèviament a Baumann [9]. El model estequiomètric utilitzat per al metabolisme central de *P. pastoris* fou també formulat d'acord amb el publicat per Baumann [9] complementat amb la via d'assimilació de metanol degut al us de substrat mixtes (Apèndix 1). D'igual forma el cicle del glioxilat i la ruta de l'enzim màlic no foren introduïdes en aquest treball, ja que les dades extretes de l'anàlisi METAFoR no mostraren una activitat apreciable d'aquestes vies, tal i com es comenta a la bibliografia per el cas de glucosa com única font de carboni [21]. Així mateix, en aquest model, el consum dels metabòlits intermediaris de les vies principals per la formació dels components macromoleculars de la biomassa (proteïnes, lípids, carbohidrats, RNA i DNA) foren calculats tal i com esta descrit en la literatura [26] i considerant les rutes biosintètiques descrites per *P. pastoris* [27][28]. Tots els fluxos metabòlics calculats foren considerat com a flux net, així dons el flux en la direcció de la reacció descrita fou considerat com a flux positiu mentre que el flux el la direcció oposada fou considerat com un valor negatiu.

Càlcul de les taxes de regeneració del NADH

El valors de la taxa de regeneració del poder reductor fou calculada a partir de la distribució de fluxos nets obtinguda. Un cop la solució al sistema metabòlic plantejat fou calculada, els fluxos metabòlics nets foren utilitats per a realitzar un càlcul teòric de la quantitat d' O_2 consumida per el sistema. Per aquest càlcul, la majoria de reaccions involucrades en el consum d' O_2 foren tingudes en compte, essencialment l'assimilació de metanol, les rutes de biosíntesis de lípids així com el balanç general d'electrons. A més a més, fou considerat que la totalitat del NADPH produït per el sistema és consumit en les reaccions biosintètiques. D'altra banda, tots els equivalents de reducció romanents es consideren introduïts a la cadena respiratòria per tal de esser reciclats. Finalment, el consum teòric d' O_2 calculat per el sistema d'estudi, fou del 92% del mesurat de forma experimental, indicant que sota les condicions experimentals proposades, les variables calculades son altament consistents amb les obtingudes experimentalment.

Resultats i discussió

Creixement i formació de productes

S'han publicat relativament pocs estudis fisiològics enfocats al potencial impacte de la producció de proteïna recombinant en el metabolisme central de *P. pastoris*, particularment en aquells casos on el producte d'interès és secretat al medi [6][9].

L'objectiu d'aquesta part del treball fou avaluar d'una forma quantitativa la carga metabòlica ocasionada per la secreció d'una proteïna recombinant de *R. oryzae* (lipasa de *Rhizopus oryzae*; Rol) en el sistema cel·lular de *P. pastoris*. Aquest enzim ha demostrat ser un model realment atractiu per diferents estudis fisiològics sobre la producció de proteïna. En aquests estudis es va demostrar que la seva expressió desencadena una resposta a proteïnes mal plegades [29] amb un efecte negatiu en els paràmetres de creixement, particularment en aquelles soques les quals expressen múltiples còpies del gen Rol [30]. Cal dir que els nivells de secreció de la proteïna d'interès amb cultius a elevades densitats cel·lulars (100 g/L) son moderats (al voltant de 300-500 mg L⁻¹) [14].

Taula 1. Paràmetres de creixement de *P.pastoris* sota condicions d'alimentació amb glucosa metanol en cultius en continu.

Soca	Glucosa mmol/g _{DCW} ·h	Metanol mmol/g _{DCW} ·h	OUR mmol/g _{DCW} ·h	CER mmol/g _{DCW} ·h	Biomassa mmol/g _{DCW} ·h	Y _{x/s} g _{DCW} /C·mol	Activitat Lipassa UA/g _{DCW}
X-33 C.	-0.76 ± 0.02	-1.15 ± 0.06	-2.95 ± 0.11	2.31 ± 0.11	3.40 ± 0.04	14.7 ± 0.3	n.d.
ROL_1	-0.85 ± 0.01	-1.29 ± 0.05	-3.71 ± 0.07	3.04 ± 0.06	3.32 ± 0.03	13.0 ± 0.3	2504 ± 192
ROL_2	-0.87 ± 0.01	-1.24 ± 0.09	-3.66 ± 0.06	3.04 ± 0.04	3.39 ± 0.05	12.9 ± 0.1	3490 ± 208

Dades reconciliades de substrats i productes consumits i excretats en estat estacionari per a cada experiment. L'índex de consistència h fou inferior a 7.8 amb una redundància de 3 (95% nivell significatiu) per tots els casos.

Per tal de caracteritzar la distribució de carboni intracel·lular com a conseqüència de la secreció de Rol, foren realitzats una bateria de cultius aeròbics en continu utilitzant una barreja de glucosa/metanol fixada al 80:20 pes/pes amb una taxa de dilució de 0.09 h⁻¹ per totes les soques d'estudi. El valor final de la velocitat de creixement fou inferior a la μ_{\max} (0.18 h⁻¹) assolida per aquesta soca alimentada amb glucosa com a única font de carboni [24] i relativament superior a la μ_{\max} (0.06 h⁻¹) alimentada amb metanol [18] com única font de carboni. Amb aquestes premisses, els cultius en continu és varen portar a terme en condicions de carboni limitant permetent així la des repressió ocasionada per la glucosa en la via d'assimilació de metanol així com la seva inducció per aquest últim substrat.

Cal dir que durant tots els experiments realitzats no fou detectat cap subproducte en el brou de cultiu, fet previsible, tenint en compte estudis previs [30]. En la Taula 1 s'observen totes les dades macromoleculares dels diferents experiments realitzats. Particularment, el consum específic de glucosa incrementa significativament de 0.76 fins 0.9 mmol g⁻¹h⁻¹, si comparem la soca control respecte les dues productores, d'altra banda en el consum de metanol no s'observa una diferència significativa tant acusada. A més a més, l'augment en la producció de Rol té com a resultat un increment en la producció de CO₂ (CER) conseqüent així amb un augment en el

consum d'O₂ (OUR), fet possiblement relacionat e ser un indicador de que s'està dedicant més font de carboni a generar equivalents energètics (ATP). Contràriament al que era d'esperar, les diferències fisiològiques entre les dues soques productores foren insignificants tot i que els nivells d'activitat enzimàtica per la soca expressiva Rol_2 foren 1.4 cops més elevats que la soca expressiva Rol_1. Així dons, és pot considerar que l'impacte en el creixement com a conseqüència de la producció d'aquesta proteïna és remarcable, tenint en compte els nivells de proteïna secretada extracel·lular relativament petits (30 mg.L⁻¹) per totes dues soques expressives i que la quantitat que representa la proteïna d'interès avaluada és del (35-40%) del total de extracel·lular. D'altra banda, sembla poc provable que aquest impacte en la fisiologia del hoste en qüestió pugui ser deguda a la demanda de precursors per la síntesis de Rol sinó més aviat com a resultat de l'estrès generat a la cèl·lula ocasionat per la síntesis d'aquesta proteïna.

Taula 2. Composició de Biomassa en C-mol per *Pastoris*

Soca	Font de Carboni	Formula de Biomassa C-mol	Relació C:N	Relació H:O	γ
<i>X-33 Control</i>	80 % Glucosa 20 % Metanol	C H _{1.687} N _{0.17} O _{0.635} S _{0.002}	5.9	2.7	3.9
<i>ROL_1</i>	80 % Glucosa 20 % Metanol	C H _{1.749} N _{0.141} O _{0.679} S _{0.002}	7.1	2.6	4.0
<i>ROL_2</i>	80 % Glucosa 20 % Metanol	C H _{1.702} N _{0.14} O _{0.643} S _{0.002}	7.1	2,6	4.0
<i>X-33 Control*</i>	100 % Glucosa	C H _{1.761} N _{0.143} O _{0.636} S _{0.0018}	7.0	2.8	4.1
<i>S.cerevisiae**</i>	100 % Glucosa	C H _{1.748} N _{0.148} O _{0.596} S _{0.0018}	6.8	2.9	4.2

*Dades extretes de [26]; ** Dades extretes de [31]

Fórmula molecular de *P. pastoris* utilitzant barreges de glucosa/metanol (80:20) com a font de carboni en cultius en continu a una velocitat de creixement de D=0.09h⁻¹; C:N relació entre Carboni i Nitrogen; H:O relació entre Hidrogen i Oxigen; γ, grau de reducció de la biomassa.

Les condicions de cultiu, al igual que els antecedents genètics, poden haver ocasionat impactes significatius en ambdues composicions elementals i macromoleculares de les cèl·lules. És per aquest motiu que és necessari un coneixement precís del valor de tots el elements que componen la biomassa (elementals i macromoleculares), amb la finalitat de realitzar un anàlisi de flux metabòlic adequat. Al no disposar de dades elementals ni macromoleculares prèvies per *P. pastoris* sota creixement amb substrats mixtes es va portar a terme aquesta caracterització prèvia al càlcul de distribució de fluxos. En les taules 2, 3 i 4 es mostren els resultats obtinguts per a cadascuna de les soques d'estudi obtinguts de la forma que es detalla en el Capítol 2 'Anàlisi de biomassa'. Aquests anàlisis ens revelen que existeixen diferències significatives (*p*-valors <0.05) en termes de contingut de proteïna relativa entre cultius alimentats amb una font de carboni diferent (glucosa vs glucosa/metanol), així com entre cultius amb diferent producció de Rol. A més a més el valor relatiu de diferents aminoàcids foren significativament diferents a (*p*-valor<0.05) comparant la soca de referència entre la soca expressiva Rol_1 (Thr, Ala) al igual que entre la soca expressiva Rol_2 (Thr, Ala, Glu, Cys, Met, Orn i Arg) (Apèndix 3). Coherent amb els anàlisis de contingut de proteïna total, els continguts de la majoria d'aminoàcids foren generalment superiors en soques creixen sota glucosa/metanol com a font de carboni que creixent sota glucosa com a única font de carboni (Apèndix 3). En conseqüència, observant aquestes diferències fou considerat que tant les diferents fonts de carboni com les diferents soques utilitzades podrien tenir un impacte en el càlcul de fluxos metabòlics, així dons, es va

decidir considerar una composició de biomassa diferent per a cadascuna de les tres soques utilitzades en aquest estudi sota creixement amb co-assimilació de substrat glucosa/metanol.

Taula 3. Composició macromolecular de la biomassa per *P. pastoris*

Soca	Proteïna pes/pes	Carbohidrats pes/pes	Lípids* pes/pes	RNA pes/pes	DNA pes/pes
<i>X-33 Control</i>	0.49 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.07 ± 0.007	0.001 ± 0.0001
<i>ROL_1</i>	0.43 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.007	0.001 ± 0.0001
<i>ROL_2</i>	0.43 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.007	0.001 ± 0.0001

*Valors calculats

Els valors estan expressats com a % del pes sec cel·lular DCW.

Impacte de la co-assimilació de metanol en el metabolisme central de *P. pastoris*

L'espectre 2D¹H-¹³C-HSQC fou analitzat d'acord amb el descrit en la bibliografia [19][20] donant les abundàncies relatives dels fragments de C2 i C3 intactes dels aminoàcids proteics (Apèndix 3). Els anàlisis dels valors-*f* obtinguts foren coherents amb les vies de síntesis establertes per llevats, tal i com es reflecteix en estudis previs [24]. La utilització d'un compost de C6 com la glucosa juntament amb un compost C1 com el metanol per l'estudi de BDF amb marcatge ¹³C d'aminoàcids proteics, va permetre la determinació de les relacions de flux associades amb l'assimilació de substrats C1 per la cèl·lula.

Quant les cèl·lules son alimentades amb glucosa com a única font de carboni, els valors-*f* de la His-*Cα* i la Phe-*Cα* han de ser pràcticament iguals degut a l'efecte de les reaccions afectades per les transaldolases i les transquetolasses [9] [22]. Ara bé, aquest dos patrons de marcatge foren diferents ens experiments d'aquest estudi (Apèndix 4) proporcionant una clara evidència de l'assimilació de metanol per el creixement cel·lular i manteniment així com reafirmant que condicions de glucosa limitant permeten la inducció de l'entrada de metanol per part d'aquest últim compost. Comportaments similars foren prèviament observats a *P. pastoris* en condicions de carboni limitant amb mesclades de glicerina/metanol [18].

Si és comparen les distribucions de fluxos metabòlics calculats en cultius consumint glucosa amb els que consumeixen glucosa/metanol (en condicions totalment aeròbiques i en cultius en continu amb limitació per la font de carboni) es pot observar un clar efecte degut a l'assimilació de metanol en la distribució de fluxos nets (Figura 1). La distribució de flux entre la branca glicolítica i la branca oxidativa de la via de les pentoses fosfat es veu clarament desplaçada cap aquesta última quant dues fonts de carboni son utilitzades conjuntament. Probablement aquest fet reflecteix la demanda de pentoses per l'assimilació de metanol així com un increment en la generació d'equivalents de reducció en forma de NADPH. D'igual forma s'observa una clara diferència en el valor del flux a través del TCA, mostrant un flux menor quant s'utilitzen substrats mixtes (escalats a l'entrada de glucosa). Aquest comportament també pot ser observat en el càlcul del flux de regeneració de NADH. És interessant comentar que en treballs previs [18] no s'observen diferències significatives quan es compara l'activitat relativa del TCA amb cèl·lules creixen amb glicerina o creixem amb barreges de glicerina-metanol com a font de carboni. Tal i com era d'esperar, degut a la diferència en el contingut de carboni utilitzat amb

substrats mixtes en cèl·lules metilotròfiques [32], l'efecte de la co-assimilació de metanol resulta en un rendiment de biomassa substrat menor (14.3 ± 0.3 g_{DCW}/C-mol) comparats amb cultius utilitzant glucosa (16.8 ± 1.2 g_{DCW}/C-mol) com única font de carboni.

Observant la Figura 1, la major part del metanol (80%) fou directament desassimilada cap a la producció de CO₂, contràriament al observat en cultius on el metanol és la única font de carboni del sistema sota condicions limitants [10]. L'assimilació de metanol té un efecte important en el comportament bioenergètic en llevats metilotròfics. Per exemple, l'oxidació directa de metanol cap a CO₂ via formaldehid i format té un rendiment de 2 mols de NADH per cada mol de metanol metabolitzat. Els primers estudis realitzats sobre el metabolisme del metanol mostraren que els enzims involucrats en la primera oxidació i assimilació de metanol o formaldehid es troben sota un control inhibitori de components directament lligats a l'aprofitament energètic, com per exemple NADH i ATP (formaldehid i format deshidrogenasa), ADP (dihidroxiacetona quinasa) i AMP (fructosa-1-6-bifosfatasa) [33]. En cèl·lules metilotròfiques aquestes vies metabòliques actuen d'una forma estretament lligada amb el balanç de consum i producció d'equivalents de reducció, amb la conseqüent regulació energètica de l'oxidació del formaldehid i la seva assimilació. Així doncs, els resultats obtinguts mostren que els cultius on s'utilitza glucosa com única font de carboni mostren una limitació en la producció de NADH, mentre que cultius on s'utilitza la co-assimilació de metanol com a substrat auxiliar poden proveir el sistema amb una font alternativa de NADH [34] el que podria explicar la disminució de l'activitat al TCA.

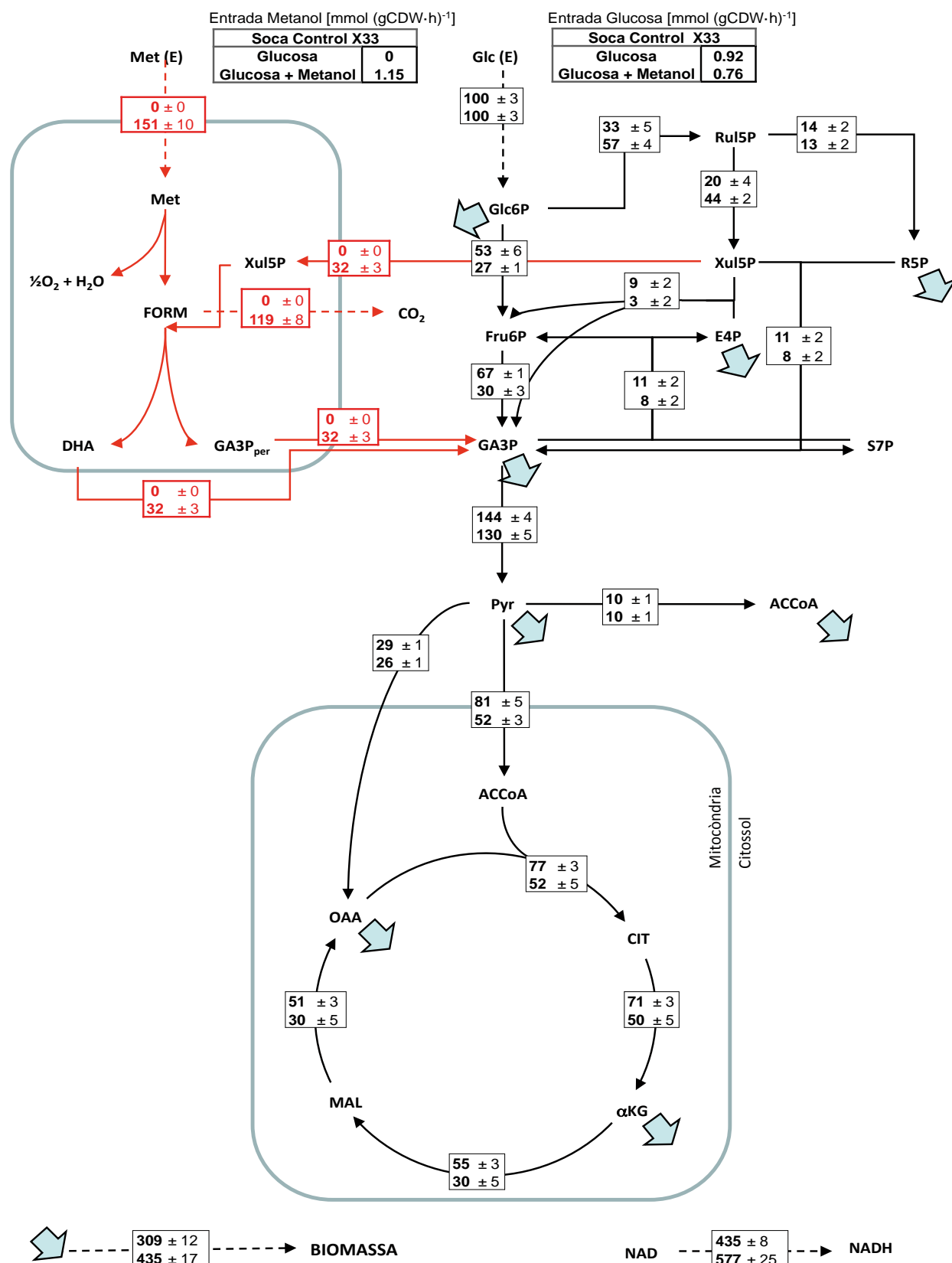


Figura 1. Distribució de fluxos metabòlics en *P. pastoris* durant el creixement amb glucosa o glucosa/metanol com a font de carboni. Distribució de flux metabòlic amb la soca X-33 Control durant el creixement amb glucosa, valors superiors, i amb glucosa/metanol, valors inferiors. El valor de tots els fluxos estan escalats a la entrada de glucosa al sistema. Activitats de l'enzim màlic i el cicle del glioxilat foren negligibles d'acord amb les bases de l'anàlisi METAFoR. Dades de fluxos amb glucosa com única font de carboni fora extretes de [9].

Impacte de la secreció de Rol en el metabolisme de carboni central de *P. pastoris*

Tal i com s'observa en estudis previs amb secreció de proteïna recombinant [30], la sobre expressió de Rol té un impacte en el consum específic de substrat. D'acord amb aquesta observació, les dues soques expressives mostren una lleugera però significant disminució en els rendiments de biomassa amb un augment de la producció de diòxid de carboni i consum de d'O₂ comparats amb la soca de referència (X-33). Aquest fenomen pot ser relacionat amb una demanda d'energia superior degut a la síntesis de Rol, donant lloc a uns nivells més elevats d'energia per el manteniment requerits per la cèl·lula. Tenint en compte que la quantitat de Rol secretada al medi es relativament petita en comparació a la quantitat de proteïna total, hom es temptat d'especular que aquesta carga metabòlica pot ser principalment associada a l'estrès ocasionat per la secreció de Rol [29][35] en lloc d'estar associada a la demanda de precursors ('building blocs') per la síntesi de la proteïna. Aquesta última afirmació, seria més creïble si la proteïna recombinant d'estudi fos produïda intercel·lularment a nivells molt més elevats en *P. pastoris* o en altres organismes hostes [11][36]. També pot estar relacionada amb un increment en la degradació de la proteïna sintetitzada a mesura que aquesta s'acumula intracel·lularment. Això representaria una mena de 'cicle fútil' donat que es consumiria energia per sintetitzar una proteïna que seria immediatament desmuntada.

Taula 5. Relacions de flux metabòlic mitjançant l'anàlisi METAFoR.

% Fracció total del pool	X-33 Control	Rol_1	Rol_2	X-33 Control*
	Glucosa/Metanol	Glucosa/Metanol	Glucosa/Metanol	Glucosa
Pep provinent de Metanol	45 ± 5	34 ± 9	24 ± 9	n.d.
Pep provinent de PPP (valor màxim)	14 ± 4	21 ± 8	24 ± 11	39 ± 9
R5P provinent T3P d S7P (transquetolassa)	77 ± 7	70 ± 1	83 ± 2	66 ± 2
R5P provinent E4P (transaldolasa)	56 ± 1	57 ± 9	56 ± 4	40 ± 2
Ser originat a partir de Gly i unitat C1	53 ± 3	55 ± 2	58 ± 1	62 ± 4
Gly originat a partir de CO ₂ i unitat C1	7 ± 1	12 ± 1	8 ± 2	6 ± 4
Pep originat a partir de Oaa _{cyt} (PepCK)	n.d.	n.d.	n.d.	2 ± 5
Oaa_{mit} originat a partir de Pep	49 ± 3	42 ± 12	36 ± 2	n.d.

*Dades extretes de [26]. Resultats de l'anàlisi METAFoR on es mostren els orígens dels metabòlits intermediaris durant el creixement de *P. pastoris* amb substrats mixtes comparats amb aquells on s'utilitza glucosa com única font de carboni, n.d. (no determinat). Els fluxos utilitzat per el càlcul MFA son ressaltats en negreta.

L'impacte de l'expressió de Rol en el metabolisme de *P. pastoris* pot ser tanmateix avaluat per els resultats de les relacions de fluxos mostrades en la Taula 5, reflexa un limitat però significatiu efecte en la secreció de Rol en la via d'assimilació de metanol, particularment en el cas de la soca Rol_2. La contribució relativa d'aquesta via a la formació de Pep disminueix a mesura que la producció de proteïna augmenta, suggerint que una quantitat més elevada de metanol assimilat és directament oxidat cap a la formació de CO₂, amb la conseqüent formació de 2 mol de NADH per mol de metanol.

D'altra banda, l'anàlisi de flux metabòlic desenvolupada en aquest estudi ens permet identificar petits però significatius canvis en el flux a través del metabolisme central (Figura 2). Tenint en compte que els valors d'entrada de glucosa foren més elevats en les soques productores els

valors dels fluxos glicolítics segueixen la mateixa tendència, comparat amb la soca control. A més, el flux procedent de la via de les pentoses cap a l'assimilació de metanol fou decreixent a mesura que la producció de proteïna incrementava, consistent amb la disminució de metanol assimilat cap a la producció de gliceraldehid-3-fosfat (GA3P), particularment per al cas de la soca Rol_2 (Figura 2.). Notablement, encara que el rendiment de biomassa per a les soques productores fou d'alguna forma inferior comparat amb la soca control (efecte el qual es reflexa en la disminució de flux cap a la formació de biomassa) el flux calculat a través de la via de les pentoses sembla ser per totes les soques molt similar. Ja que es podria esperar una certa correlació entre el rendiment de biomassa i l'activitat de les pentoses [37], aquest efecte podria ser degut a un efecte en l'increment de demanda de equivalents de reducció (NADH) per generar glutatona reduïda (GSH) en el reticle endoplasmàtic (ER), considerada com el donador d'electrons durant el procés oxidatiu de plegament de proteïnes [38][39]. Resulta interessant el fet que el procés de desassimilació directa de metanol cap a CO₂ implica un pas oxidatiu utilitzant la GSH com a acceptor d'electrons.

Un altra evidència ocasionada per la carrega metabòlica, derivada de la expressió de Rol fou indicada amb un increment significatiu del flux relatiu a través del TCA en les soques productores de Rol. A més, una tendència a l'increment de flux cap a la via de desassimilació de metanol fou observada en les soques productores de Rol comparat amb la soca control. Coherent amb aquesta observació, la producció de CO₂ fou incrementada igual que el quocient respiratori (RQ) (Taula 1) el que sembla reflectir un significatiu increment en la generació de NADH i probablement en la producció de ATP. Aquest fet suggeriria que la carga metabòlica ocasionada per la secreció de Rol està compensada per un augment en la producció d'energia. Així doncs, les soques productores de Rol aparenten un major requeriment energètic associat al manteniment comparat amb la soca control. Tal i com s'ha comentat anteriorment, els nivells de producció de Rol obtinguts son relativament moderats, llavors la correlació observada entre la secreció específica de Rol i els valors de regeneració de NADH obtinguts ens proporcionen una evidència indirecta en la carrega metabòlica associada amb el plegament de proteïnes i l'estrès conformacional.

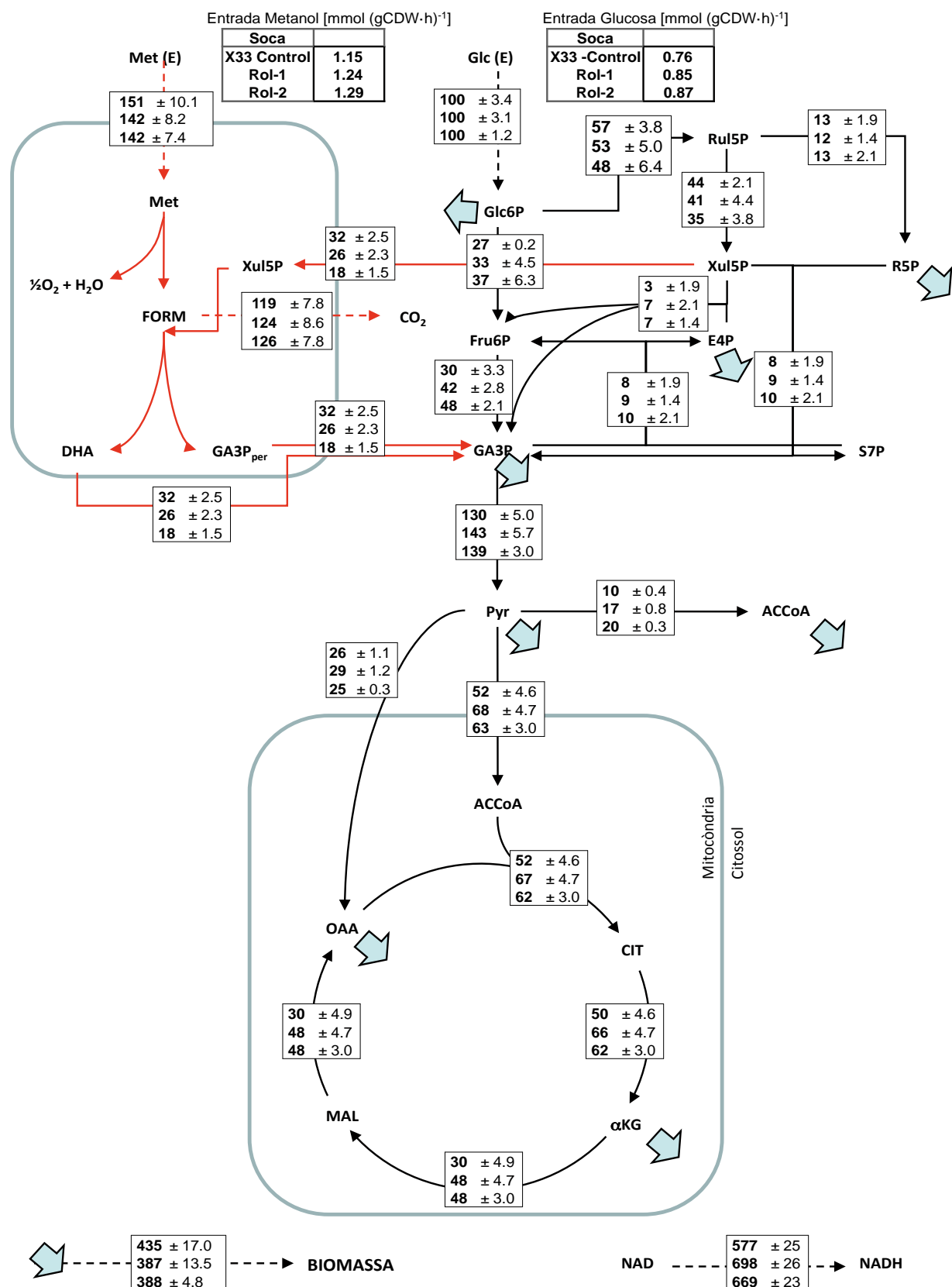


Figura 2. Distribucions de flux metabòlic en *P. pastoris* en les diferents soques d'estudi durant el creixement amb substrat mixtes glucosa/metanol.

Distribucions de fluxos en *Pastoris*. El primer valor correspon a X-33 Control, el valor central correspon a la soca Rol_1 mentre que el valor final correspon a la soca Rol_2. Tots els fluxos estan normalitzats per la corresponent entrada de glucosa al sistema. Activitats de l'enzim màlic i el cicle del glioxilat foren negligibles d'acord amb les bases de l'anàlisi METAFoR.

Resulta interessant que el treball publicat per Heyland [11] observa un efecte similar en la distribució de fluxos global durant el seu treball. Un augment de flux a través del TCA de 1.1 mmol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$ en la soca productora comparat amb un 0.7 mmol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$ de la soca control amb *P. pastoris* produint una proteïna recombinant intracel·lular en cultius discontinus a una velocitat de creixement de $0.12h^{-1}$. D'altra banda, a un estudi recent publicat per el mateix grup [36], una sèrie de soques de *P. pastoris* expressant diferents nivells de proteïna recombinant i creixent de forma exponencial en erlenmeyers (a màxima velocitat de creixement) es varen comparar revelant un increment en el flux relatiu en l'activitat del TCA a les soques productores comparades amb la soca control, mentre que l'activitat absoluta del TCA roman constant amb un valor de 2.1 ± 0.1 mmol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$ per totes les soques. Aquest fet suggereix un límit superior d'activitat per al cicle dels àcids tri carboxílics, postulant que les cèl·lules no tenen la capacitat de catabolitzar la suficient quantitat de carboni a través del TCA per generar l'energia necessària derivada de la sobreproducció de proteïna recombinant. En aquest estudi, el valor de la activitat del TCA fou de 0.39 ± 0.03 mmol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$, 0.55 ± 0.03 mmol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$ i 0.57 ± 0.04 μ mol $g_{DCW}\cdot h^{-1}$ per la soca control, Rol_1 i Rol_2 respectivament, clarament inferior al màxim valor hipotètic calculat per el TCA en *P. pastoris* sota condicions aeròbiques amb glucosa com a font de carboni.

Tenint en compte aquesta premissa, en el present treball existeix un increment significatiu en el flux absolut a través del cicle en les soques productores de Rol, així doncs, sembla coherent l'afirmació de que no existeixen limitacions energètiques en aquest nivell de producció amb substrats mixtes. De fet, la co-assimilació de metanol com a substrat auxiliar podria ser el mecanisme per el qual l'increment d'energia és compensada durant el procés de síntesis de proteïna recombinat.

Conclusions

Com a resultat d'aquest capítol, la metodologia MFA basada en restriccions ^{13}C mitjançant ressonància magnètica nuclear 'NMR' a estat estesa al metabolisme del metanol, permeten així un anàlisi metabòlic de soques de *P. pastoris* recombinant sota condicions de creixement amb substrats mixtes. Aquesta metodologia, ens permet la quantificació addicional de requeriments energètics derivat de l'adaptació de les cèl·lules a l'estrès ocasionat per la secreció d'una proteïna recombinant. S'ha de remarcar que encara que limitat, hem observat un impacte en el metabolisme energètic fins i tot per a nivells de secreció relativament petits quant es comparen les dues soques productores, suggerint que el plegament de proteïnes i l'estrès conformacional imposen una càrrega extra en el metabolisme central. Per tant, aquesta càrrega metabòlica és un punt de partida important per futurs estudis en la producció de proteïna recombinant en llevats metilotròfics. Les diferents estratègies a emprar podrien tenir en compte l'Enginyeria genètica de soques amb requeriments energètics amb un manteniment menor o el disseny de millores en els mecanismes de cultiu.

D'altra banda, les diferències metabòliques observades entre les dues soques productores Rol_1 i Rol_2 no foren estadísticament significatives, suggerint que son necessàries diferències més acusades en els nivells d'expressió/secreció per detectar un impacte en el metabolisme central.

Finalment el metanol sembla mostrar un paper fonamental com a substrat auxiliar per compensar els increments de demanda energètica derivats de la secreció de proteïna així com afavorint l'adaptació a nous requeriments. Aquesta observació podria ser una explicació de per què la utilització de substrats mixtes com estratègia d'alimentació potencien la productivitat i redueixen la carga metabòlica en *P. pastoris*.

Apèndix

1.1 Model metabòlic utilitzat pel càlcul de fluxos.

Assimilació de Metanol

Met1.	Met => FORM
Met2.	FORM => FOR + NADH
Met3.	FOR => NADH + CO ₂
Met4.	Xul5P + FORM + ATP => ADP + GA3P _{per} + DHA
Met5.	GA3P _{per} => GA3P
Met6.	DHA => GA3P

Vies Glicolítiques i Gluconeogèniques

emp1.	GLC + ATP => Glu6P + ADP
emp2.	Glu6P <=> Fru6P
emp3.	Fru6P + ATP => 2GA3P + ADP
emp4.	2 GA3P => Fru6P + Pi
emp5.	GA3P + ADP + Pi => PG3 + ATP + NADH
emp6.	PG3 + ATP + NADH => GA3P + ADP + Pi
emp7.	PG3 <=> Pep
emp8.	Pep + ADP => Pyr + ATP
emp9.	Pyr => ACCoA _{mit} + CO ₂ + NADH _{mit}
emp10.	Pyr => ACCoA _{cyt} + CO ₂ + NADH _{cyt}
emp11.	Pyr + CO ₂ + ADP => Oaa + ATP

Via de les Pentoses fosfat

ppp1.	Glu6P + 2NADP => Rul5P + 2 NADPH + CO ₂
ppp2.	Rul5P <=> R5P
ppp3.	Rul5P <=> Xul5P
ppp4.	R5P + Xul5P <=> S7P + GA3P
ppp5.	S7P + GA3P <=> Fru6P + E4P
ppp6.	Xul5P + E4P <=> Fru6P + GA3P

Cicle dels Àcids tri carboxílics

tca1.	ACCoA _{mit} + Oaa => CIT
tca2.	CIT => ICIT
tca3.	ICIT => αKG + CO ₂ + NADH _{mit}
tca4.	αKG => SUCCoA + CO ₂ + NADH _{mit}
tca5.	SUCCoA + Pi + ADP => SUC + ATP
tca6.	SUC + ATP => SUCCoA + ADP + Pi
tca7.	SUC => FUM + FADH ₂
tca8.	FUM <=> MAL
tca9.	MAL => Oaa + NADH _{mit}

Biosíntesis dels diferents aminoàcids

Família de la Serina

1. PG3 + Glu => Ser + αKG + NADH + Pi
2. Ser + THF => Gly + MetTHF
3. Ser + ACCoA + H₂S => Cys

Família de l'Alanina

4. $\text{Pyr} + \text{NADPH} \Rightarrow \text{Ala} + \text{NADP}$
5. $\text{Pyr} + \text{Glu} \Rightarrow \alpha\text{KG}$
6. $2 \text{Pyr} + \text{NADPH}_{\text{mit}} \Rightarrow \text{Kval} + \text{CO}_2$
7. $\text{Kval} + \text{Glu} \Rightarrow \text{Val} + \alpha\text{KG}$
8. $\text{Kval} + \text{ACCoA}_{\text{mit}} + \text{Glu} \Rightarrow \text{Leu} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{CO}_2$

Família de l' Histidina

9. $\text{R5P} + \text{ATP} \Rightarrow \text{PRPP} + \text{AMP}$
10. $\text{PRPP} + \text{ATP} + \text{Gln} \Rightarrow \text{His} + \alpha\text{KG} + \text{Pi} + 2 \text{NADH}$

Família de l'Aspartat

11. $\text{Oaa} + \text{Glu} \Rightarrow \text{Asp} + \alpha\text{KG}$
12. $\text{Asp} + \text{Gln} + \text{ATP} \Rightarrow \text{Asn} + \text{Glu} + \text{AMP}$
13. $\text{Asp} + \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \Rightarrow \text{Ser} + \text{ADP} + \text{Pi}$
14. $\text{Thr} + \text{NADPH}_{\text{mit}} + \text{Glu} + \text{Pyr} \Rightarrow \text{Ile} + \alpha\text{KG} + \text{NH}_4 + \text{CO}_2$
15. $\text{ACCoA} + \text{Ser} + \text{H}_2\text{S} + \text{MTHF} \Rightarrow \text{Met} + \text{THF}$

Família de compostos Aromàtics

16. $2 \text{Pep} + \text{E4P} + \text{ATP} + \text{NADPH} \Rightarrow \text{CHOR} + \text{ADP} + 4 \text{Pi}$
17. $\text{CHOR} + \text{Glu} \Rightarrow \text{Phe} + \alpha\text{KG} + \text{CO}_2$
18. $\text{CHOR} + \text{Glu} \Rightarrow \text{Tyr} + \alpha\text{KG} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
19. $\text{CHOR} + \text{Gln} + \text{PRPP} + \text{Ser} \Rightarrow \text{Trp} + \text{Glu} + \text{Pyr} + \text{GA3P} + \text{CO}_2$

Família del Glutamat

20. $\alpha\text{KG} + \text{NH}_4 + \text{NADPH} \Rightarrow \text{Glu}$
21. $\text{Glu} + \text{ATP} + \text{NH}_4 \Rightarrow \text{Gln} + \text{ADP} + \text{Pi}$
22. $\text{Glu} + \text{ATP} + 2 \text{NADPH} \Rightarrow \text{Pro} + \text{ADP} + \text{Pi}$
23. $\text{Gln} + \text{CO}_2 + 2 \text{ATP} \Rightarrow \text{CaP} + \text{Glu} + 2 \text{ADP} + \text{Pi}$
24. $\text{Glu} + \text{ACCoA} + 4 \text{ATP} + \text{NADPH}_{\text{mit}} + \text{CaP} + \text{Asp} \Rightarrow \text{Arg} + \alpha\text{KG} + 4 \text{ADP} + \text{FUM} + 5 \text{Pi}$
25. $2 \text{Glu} + \text{ACCoA} + 3 \text{ATP} + 2 \text{NADPH}_{\text{mit}} \Rightarrow \text{Lys} + \alpha\text{KG} + \text{CO}_2 + 2 \text{NADH}$

Biosíntesis i interconverció de unitats d'un carboni

26. $\text{DHF} + \text{NADPH} \Rightarrow \text{THF}$
27. $\text{Gly} + \text{THF} \Rightarrow \text{MetTHF} + \text{NH}_4 + \text{NADH} + \text{CO}_2$
28. $\text{MetTHF} + \text{NADH} \Rightarrow \text{THF}$

Reaccions de transport utilitzades

29. $\text{CO}_2 \Rightarrow \text{exp}$
30. $\text{imp} \Rightarrow \text{CO}_2$
31. $\text{imp} \Rightarrow \text{NH}_4$
32. $\text{NH}_4 \Rightarrow \text{exp}$
33. $\text{imp} \Rightarrow \text{Pi}$
34. $\text{Pi} \Rightarrow \text{exp}$
35. $\text{NAD} \Rightarrow \text{NADH}_{\text{mit}}$

Síntesis de biomassa

Síntesis de Proteïna

X-33 Soca Control

36. $0.1488 \text{ Pyr} + 0.00725 \text{ R5P} + 0.0147 \text{ E4P} + 0.0633 \alpha\text{KG}_{\text{mit}} + 0.044 \text{ Oaa}_{\text{mit}} + 0.0137 \text{ ACCoA}_{\text{cyt}} \Rightarrow$
 $1 \text{ C-mol Proteïna} + 0.004 \text{ GA3P} + 0.0448 \text{ CO}_2$

X-33 Rol 1

37. $0.1419 \text{ Pyr} + 0.0068 \text{ R5P} + 0.014 \text{ E4P} + 0.0419 \text{ Oaa}_{\text{mit}} + 0.0681 \alpha\text{KG} + 0.0136 \text{ ACCoA}_{\text{cyt}} \Rightarrow 1$
 $\text{C-mol Proteïna} + 0.0029 \text{ GA3P} + 0.0445 \text{ CO}_2$

X-33 Rol 2

38. $0.1491 \text{ Pyr} + 0.00699 \text{ R5P} + 0.0153 \text{ E4P} + 0.044 \text{ Oaa}_{\text{mit}} + 0.062 \alpha\text{KG} + 0.01454 \text{ ACCoA}_{\text{cyt}} \Rightarrow 1$
 $\text{C-mol Proteïna} + 0.0031 \text{ GA3P} + 0.0502 \text{ CO}_2$

Síntesis de Carbohidrats

39. $0.113 \text{ Glu6P} + 0.053 \text{ Fru6P} \Rightarrow 1 \text{ C-mol Carbohidrat}$

Síntesis de Lípids (Composició derivada de la fracció de lípid mig proposada en [26])

40. $0.002 \text{ Glu6P} + 0.0055 \text{ Pyr} + 0.011 \text{ GA3P} + 0.006 \text{ CO}_2 + 0.039 \text{ ACCoA}_{\text{mit}} + 0.441 \text{ ACCoA}_{\text{cyt}} +$
 $0.065 \text{ O}_2 \Rightarrow 1 \text{ C-mol Lípid}$

Síntesis de RNA (Composició derivada de la proposada per Stephanopoulos [40])

$0.056 \text{ Pyr} + 0.1136 \text{ CO}_2 + 0.105 \text{ R5P} + 0.0479 \text{ Oaa}_{\text{mit}} \Rightarrow 1 \text{ C-mol RNA}$

Síntesis de DNA (composició derivada de la publicada en [4])

41. $0.051 \text{ Pyr} + 0.132 \text{ CO}_2 + 0.102 \text{ R5P} + 0.051 \text{ Oaa}_{\text{mit}} \Rightarrow 1 \text{ C-mol DNA}$

Síntesis de proteïna recombinant ‘ROL’

42. $0.171 \text{ Pyr} + 0.0067 \text{ R5P} + 0.022 \text{ E4P} + 0.0472 \text{ Oaa}_{\text{mit}} + 0.0454 \alpha\text{KG} + 0.0112 \text{ ACCoA}_{\text{cyt}} \Rightarrow 1 \text{ C-}$
 $\text{mol Proteïna} + 0.0022 \text{ GA3P} + 0.0689 \text{ CO}_2$

Apèndix 2

2.1 Restriccions de fluxos considerades en el sistema metabòlic plantejat, tenint en compte les reaccions descrites en l'apèndix 1.

2.1.1 Fracció de Pep originaria a través de l'assimilació de metanol.

$$a = \frac{2 \cdot \epsilon_{mp4}}{2 \cdot \epsilon_{mp4} + 2 \cdot \epsilon_{mp3} + p_{pp4} + p_{pp6}} \quad \text{Eq. A1}$$

2.1.2 Fracció de Pep originaria a través de la via de les Pentoses fosfat.

$$b = \frac{p_{pp4} + 2 \cdot p_{pp5} + 3 \cdot p_{pp6}}{2 \cdot \epsilon_{mp3} + p_{pp4} + p_{pp6} + 2 \cdot \epsilon_{mp4}} \quad \text{Eq. A2}$$

2.1.3 Fracció de Oaa_{mit} originària a través de Pyr_{cit} .

$$c = \frac{\text{emp11}}{\text{leu9} + \text{emp11}} \quad \text{Eq. A3}$$

2.2. Equacions lineals obtingudes a partir de les restriccions de fluxos anteriorment formulades.

$$R_a = (1 - a) \cdot 2 \cdot \text{emp4} + 2 \cdot a \cdot \text{emp3} - a \cdot \text{ppp4} - a \cdot \text{ppp5} \quad \text{Eq. A4}$$

$$R_b = (1 - b) \cdot \text{ppp4} + 2 \cdot \text{ppp5} - b \cdot 2 \cdot \text{emp4} - b \cdot 2 \cdot \text{emp3} + \text{ppp6} \cdot (3 - b) \quad \text{Eq. A5}$$

$$R_c = (1 - c) \cdot \text{emp11} - \text{lea9} \quad \text{Eq. A6}$$

Apèndix 3

3.1 Composició aminoacídica de les diferents soques de *P. pastoris*

% mol/mol	80 % Glucosa 20 % Metanol			100 % Glucosa	
	X-33 Control	ROL_1	ROL_2	X-33*	<i>S. cerevisiae</i> **
Arg	8.15	7.67	6.45	7.04	3.86
Asp	9.25	9.48	10.05	8.78	9.28
Thr	6.15	6.06	6.46	5.88	5.57
Ser	6.34	6.32	6.82	6.26	5.33
Glu	15.76	15.44	13.23	17.81	15.48
Pro	4.2	4.0	3.92	3.83	4.22
Gly	7.80	7.53	7.86	6.86	8.89
Ala	11.14	9.41	9.36	10.40	9.77
Val	6.81	6.67	6.54	5.88	7.33
Cys	0.17	0.19	0.13	0.15	0.14
Met	0.78	0.75	0.62	0.79	1.14
Ile	4.49	4.49	4.69	4.64	5.89
Leu	7.50	7.45	8.34	6.96	8.01
Tyr	2.28	2.19	2.51	2.16	1.96
Phe	3.44	3.31	3.61	3.20	3.76
Orn	0.68	0.32	0.26	1.04	0.24
Lys	6.77	6.77	7.21	6.41	6.57
His	2.10	1.94	1.95	1.89	1.93
Trp	1.00	1.00	1.00	1.40	1.96

*Dades extretes de [26]; **Dades extretes de [41]

Composició aminoacídica de tot l'extracte cel·lular per a les soques de *P. pastoris* en aquest estudi. Les dades representen el percentatge de cada aminoàcid en el pool total d'aminoàcids. La desviació estàndard del mètode analític fou entre el 3-5%.

Apèndix 4

4.1 Abundàncies relatives dels fragments de carboni intactes C2 i C3 dels aminoàcids proteínogènics

4.1.1 Primera sèrie d'experiments amb marcatge ¹³C

<i>Soques Experiments 1</i>												
Àtom C	X-33 control				X-33 ROL_1				X-33 ROL_2			
	<i>f</i> ⁽¹⁾	<i>f</i> ⁽²⁾	<i>f</i> ^(2*)	<i>f</i> ⁽³⁾	<i>f</i> ⁽¹⁾	<i>f</i> ⁽²⁾	<i>f</i> ^(2*)	<i>f</i> ⁽³⁾	<i>f</i> ⁽¹⁾	<i>f</i> ⁽²⁾	<i>f</i> ^(2*)	<i>f</i> ⁽³⁾
Ala-Cα	0.224	0.153	0.104	0.518	0.211	0.148	0.069	0.572	0.23	0.137	0.072	0.561
Ala-Cβ	0.356	0.644	-	-	0.31	0.69	-	-	0.313	0.687	-	-
Arg-Cβ	0.673	0.327	-	0	0.646	0.36	-	0	0.723	0.254	-	0
Arg-Cδ	0.401	0.599	-	-	0.329	0.671	-	-	0.315	0.685	-	-
Asp-Cα	0.46	0.146	0.272	0.133	0.41	0.156	0.289	0.146	0.445	0.125	0.291	0.14
Asp-Cβ	0.502	0.224	0.204	0.070	0.429	0.227	0.254	0.09	0.465	0.183	0.278	0.07
Glu-Cα	0.459	0.208	0.252	0.08	0.468	0.192	0.303	0.036	0.459	0.189	0.279	0.073
Glu-Cβ	0.729	0.271	-	0	0.67	0.329	-	0	0.736	0.34	-	0
Glu-Cγ	0.389	0	0.611	0	0.289	0.009	0.701	0	0.288	0	0.721	0
Gly-Cα	0.465	0.535	-	-	0.45	0.55	-	-	0.42	0.58	-	-
His-Cα	0.174	0.077	0.074	0.674	0.19	0.045	0.036	0.728	0.224	0	0.065	0.739
His-Cβ	0.371	0.449	0	0.181	0.259	0.439	0.001	0.301	0.352	0.492	0	0.19
His-Cδ ²	0.571	0.429	-	-	0.508	0.492	-	-	0.538	0.462	-	-
Ile-Cα	0.623	0	0.377	0	0.572	0	0.428	0	0.604	0	0.4	0
Ile-Cγ ¹	0.733	0.267	-	0	0.574	0.354	-	0	0.734	0.302	-	0
Ile-Cγ ²	0.425	0.575	-	-	0.313	0.687	-	-	0.33	0.67	-	-
Ile-Cδ	0.761	0.239	-	-	0.66	0.34	-	-	0.763	0.237	-	-
Leu-Cα	0.405	0	0.595	0	0.349	0	0.651	0	0.365	0	0.625	0
Leu-Cβ	1	0	-	0	0.895	0.105	-	0	1	0	-	0
Leu-Cδ ¹	0.435	0.565	-	-	0.37	0.63	-	-	0.35	0.65	-	-
Leu-Cδ ²	1	0	-	-	0.982	0.018	-	-	1	0	-	-
Lys-Cα	0.366	0	0.634	0	0.366	0	0.633	0	0.319	0	0.681	0
Lys-Cβ	0.754	0.145	-	-	0.7	0.294	-	-	0.769	0.227	-	-
Lys-Cγ	0.719	0.281	-	-	0.689	0.308	-	-	0.741	0.259	-	-
Lys-Cδ	0.411	0.589	-	-	0.32	0.68	-	-	0.306	0.694	-	-
Lys-Cε	0.402	0.598	-	-	0.328	0.672	-	-	0.329	0.671	-	-
Met-Cα	0.414	0.177	0.227	0.181	0.424	0.126	0.243	0.207	0.382	0.161	0.281	0.176
Phe-Cα	0.265	0.16	0.123	0.451	0.228	0.138	0.073	0.562	0.267	0.118	0.032	0.582
Phe-Cβ	0.382	0.618	0	0	0.305	0.695	0	0	0.276	0.724	0	0
Pro-Cα	0.492	0.202	0.241	0.065	0.391	0.207	0.286	0.117	0.448	0.195	0.289	0.067
Pro-Cβ	0.626	0.352	-	0.021	0.48	0.373	-	0.147	0.708	0.237	-	0.055
Pro-Cγ	0.407	0.593	-	0	0.302	0.664	-	0.034	0.312	0.688	-	0
Pro-Cδ	0.4	0.6	-	-	0.324	0.676	-	-	0.309	0.691	-	-
Ser-Cα	0.328	0.094	0.265	0.313	0.271	0.101	0.24	0.388	0.285	0.075	0.241	0.399
Ser-Cβ	0.628	0.372	-	-	0.546	0.454	-	-	0	1	-	-
Thr-Cα	0.48	0.155	0.242	0.123	0.417	0.162	0.28	0.142	0.478	0.129	0.26	0.134

Distribució de fluxos en *P. pastoris* mitjançant metodologia ^{13}C

Thr-C β	0.461	0.314	0.155	0.07	0.387	0.378	0.133	0.102	0.448	0.339	0.163	0.04
Thr-C γ^2	0.689	0.311	-	-	0.622	0.378	-	-	0.63	0.37	-	-
Tyr-C α	0.256	0.152	0.136	0.456	0.229	0.139	0.104	0.528	0.26	0.116	0.051	0.573
Tyr-C β	0.402	0.598	-	-	0.302	0.698	-	-	0.318	0.682	-	-
Tyr-C δ^x	0.336	0.664	-	0	0.281	0.719	-	0	0.28	0.721	-	0
Tyr-C ϵ^x	0.56	0.07	0.108	0.256	0.519	0.062	0.13	0.289	0.519	0.047	0.108	0.325
Val-C α	0.435	0	0.565	0	0.365	0	0.623	0.011	0.373	0	0.627	0
Val-C γ^1	0.428	0.572	-	-	0.996	0	-	-	0.315	0.685	-	-
Val-C γ^2	1	0	-	-	0.937	0.062	-	-	0.992	0.008	-	-

En la primera columna es reflexa el carboni en el qual l'estructura ^{13}C es observada. Tots els valors- f foren calculats de la forma descrita per [19] per cultius en continu de *P. pastoris* a una $\mu=0.09\text{h}^{-1}$ en barreges de glucosa:metanol. Comentar que per els carbonis terminals els valors de $f^{(2*)}$ i $f^{(3)}$ no son identificables, mentre que en el cas on el valor $f^{(2*)}$ no s'observa per un carboni situat al mig d'una cadena carbonatada, es degut a que la constant d'acoblament dels dos doblats diferents es pràcticament igual.

4.1.2 Segona sèrie d'experiments de marcatge ^{13}C

<i>Soques Experiments 2</i>												
Àtom C	X-33 control				X-33 ROL_1				X-33 ROL_2			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala-C α	0.241	0.205	0.099	0.456	0.237	0.186	0.07	0.507	0.261	0.156	0.051	0.532
Ala-C β	0.333	0.667	-	-	0.334	0.666	-	-	0.342	0.658	-	-
Arg-C β	0.656	0.335	-	0	0.666	0.304	-	0	0.657	0.318	-	0.025
Arg-C δ	0.403	0.597	-	-	0.378	0.622	-	-	0.372	0.628	-	-
Asp-C α	0.464	0.167	0.23	0.139	0.404	0.161	0.278	0.157	0.483	0.108	0.274	0.135
Asp-C β	0.449	0.234	0.254	0.063	0.379	0.256	0.271	0.094	0.494	0.164	0.267	0.075
Glu-C α	0.420	0.247	0.258	0.075	0.388	0.233	0.276	0.103	0.501	0.173	0.274	0.052
Glu-C β	0.646	0.354	-	0	0.636	0.364	-	0	0.772	0.229	-	0
Glu-C γ	0.345	0	0.646	0	0.325	0	0.665	0	0.368	0	0.632	0
Gly-C α	0.433	0.567	-	-	0.434	0.566	-	-	0.447	0.553	-	-
His-C α	0.184	0.054	0.073	0.690	0.191	0.049	0.080	0.68	0.245	0.016	0.062	0.677
His-C β	0.263	0.451	0	0.286	0.306	0.426	0	0.268	0.329	0.465	0	0.205
His-C δ^2	0.554	0.446	-	-	0.637	0.363	-	-	0.587	0.413	-	-
Ile-C α	0.598	0	0.402	0	0.582	0	0.418	-	0.604	0	0.396	0
Ile-C γ^1	0.708	0.257	-	0	0.658	0.295	-	0	0.699	0.301	-	0
Ile-C γ^2	0.401	0.599	-	-	0.335	0.665	-	-	0.351	0.649	-	-
Ile-C δ	0.744	0.256	-	-	0.713	0.287	-	-	0.694	0.306	-	-
Leu-C α	0.401	0	0.599	0	0.369	0	0.631	0	0.384	0	0.616	0
Leu-C β	0.94	0.027	-	0.033	0.99	0	-	0.01	0.99	0	-	0.01
Leu-C δ^1	0.449	0.551	-	-	0.361	0.639	-	-	0.381	0.619	-	-
Leu-C δ^2	0.981	0.019	-	-	0.927	0.073	-	-	1	0	-	-
Lys-C α	0.314	0.024	0.662	0	0.384	0	0.592	0.024	0.366	0	0.634	
Lys-C β	0.682	0.273	-	0.045	0.385	0.593	-	0.022	0.756	0.199	-	0.018
Lys-C γ	0.654	0.305	-	0.041	0.649	0.317	-	0.034	0.71	0.29	-	0
Lys-C δ	0.397	0.603	-	-	0.362	0.044	0.594	0	0.37	0.017	0.613	-

Lys-Cε	0.401	0.599	-	-	0.37	0.63	-	-	0.373	0.627	-	-
Met-Cα	0.403	0.119	0.256	0.222	0.43	0.128	0.243	0.199	0.45	0.098	0.291	0.162
Phe-Cα	0.237	0.162	0.143	0.458	0.257	0.129	0.105	0.51	0.282	0.11	0.067	0.54
Phe-Cβ	0.378	0.622	0	0	0.338	0.662	0	0	0.351	0.649	0	0
Pro-Cα	0.498	0.236	0.216	0.050	0.437	0.206	0.248	0.135	0.499	0.166	0.262	0.074
Pro-Cβ	0.668	0.33	-	0.002	0.656	0.344	-	0	0.744	0.256	-	0
Pro-Cγ	0.408	0.592	-	0	0.372	0.617	-	0.011	0.374	0.616	-	0
Pro-Cδ	0.405	0.595	-	-	0.367	0.633	-	-	0.377	0.623	-	-
Ser-Cα	0.274	0.116	0.254	0.356	0.268	0.094	0.262	0.376	0.333	0.072	0.236	0.352
Ser-Cβ	0.559	0.441	-	-	0.557	0.443	-	-	0.586	0.414	-	-
Thr-Cα	0.471	0.142	0.253	0.135	0.443	0.176	0.238	0.143	0.502	0.116	0.271	0.11
Thr-Cβ	0.449	0.156	0.33	0.066	0.409	0.35	0.15	0.091	0.489	0.306	0.146	0.059
Thr-Cγ ²	0.654	0.346	-	-	0.582	0.418	-	-	0.673	0.327	-	-
Tyr-Cα	0.236	0.177	0.134	0.452	0.22	0.145	0.093	0.542	0.288	0.12	0.0721	0.521
Tyr-Cβ	0.394	0.606	0	0	0.36	0.64	0	0	0.347	0.653	0	0
Tyr-Cδ ^x	0.339	0.661	-	0	0.259	0.672	-	0.04	0.309	0.691	-	0
Tyr-Cε ^x	0.469	0.071	0.139	0.321	0.523	0.056	0.136	0.285	0.586	0.03	0.107	0.277
Val-Cα	0.415	0	0.585	0	0.384	0	0.616	0	0.393	0	0.607	0
Val-Cγ ¹	0.405	0.595	-	-	0.374	0.626	-	-	0.408	0.592	-	-
Val-Cγ ²	0.947	0.053	-	-	1	0	-	-	0.978	0.022	-	-

En la primera columna es reflexa el carboni en el qual l'estructura ¹³C es observada. Tots els valors-*f* foren calculats de la forma descrita per [19] per cultius en continu de *P. pastoris* a una $\mu=0.09\text{h}^{-1}$ en barreges de glucosa:metanol. Comentar que per els carbonis terminals els valors de $f^{(2*)}$ i $f^{(3)}$ no son identificables, mentre que en el cas on el valor $f^{(2*)}$ no s'observa per un carboni situat al mig d'una cadena carbonatada, es degut a que la constant d'acoblament dels dos dobles diferents es pràcticament igual.

Bibliografia

1. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM: **Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system.** *Yeast* 2005, **22**:249–270.
2. Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F: **Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review.** *Microbial Cell Factories* 2006, **5**:17.
3. Bollok M, Resina D, Valero F, Ferrer P: **Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: Expanding the toolbox for recombinant protein production.** *Recent Patents on Biotechnology* 2009, **3**:192 – 201.
4. Schutter K De, Lin Y, Tiels P, Hecke A Van, Glinka S, Peer Y Van De, Callewaert N, Weber-lehmann J, Rouze P: **Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*.** *Nature Biotechnology* 2009, **27**:561–566.
5. Graf AB, Gasser B, Dragosits M, Sauer M, Leparc GG, Tüchler T, Kreil DP, Mattanovich D: **Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays.** *BMC Genomics* 2008, **13**:1–13.
6. Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P, Mattanovich D, Cerdanyola B: **The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris* research articles.** *Journal of Proteome Research* 2009:1380–1392.
7. Görgens J, Van Zyl W, Knoetze J, Hahn-Hägerdal B: **The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium.** *Biotechnology and bioengineering* 2001, **73**:238–45.
8. Vigentini I, Brambilla L, Branduardi P, Merico A, Porro D, Compagno C: **Heterologous protein production in *Zygosaccharomyces bailii*: physiological effects and fermentative strategies.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:647–52.
9. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P: **A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**:141.
10. Celik E, Calik P, Oliver SG: **Metabolic flux analysis for recombinant protein production by *Pichia pastoris* using dual carbon sources: Effects of methanol feeding rate.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **105**:317–29.
11. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A: **Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **107**:357–368.
12. Harder, M. Veenhuis M: **Metabolism of one-carbon compounds.** In *The Yeasts*. 2nd Editio. edited by JS H, AH R New York: Academic Press; 1989:289 – 316.
13. Ramón R, Ferrer P, Valero F: **Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2007, **130**:39–46.
14. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2001, **86**:59–70.

15. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D: **Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins.** *Biotechnology and Bioengineering* 2008, **100**:177–83.
16. De Jong-Gubbels P, Vanrolleghem P, Heijnen S, Van Dijken JP, Pronk JT: **Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol.** *Yeast (Chichester, England)* 1995, **11**:407–18.
17. Vandercammen a, François J, Hers HG: **Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1989, **182**:613–20.
18. Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Szyperski T, Ferrer P: **Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol / methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates.** *Microbiology* 2007:433–448.
19. Szyperski T: **Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1995, **232**:433–448.
20. Szyperski T, Glaser RW, Hochuli M, Fiaux J, Sauer U, Bailey JE, Wüthrich K: **Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional ¹³C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy.** *Metabolic Engineering* 1999, **1**:189–97.
21. Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H: **Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**:60.
22. Maaheimo H, Fiaux J, Cakar ZP, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T: **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (¹³C) labeling of common amino acids.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2001, **268**:2464–2479.
23. Arita M: **Introduction to the ARM Database: Database on Chemical Transformations in Metabolism for Tracing Pathways.** *Metabolomics* 2005:193–210.
24. Solà A, Maaheimo H, Ylönen K, Ferrer P, Szyperski T: **Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2004, **271**:2462–2470.
25. Fischer E, Zamboni N, Sauer U: **High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived ¹³C constraints.** *Analytical Biochemistry* 2004, **325**:308–316.
26. Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P, Albiol J: **Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:65.
27. Chung BKS, Selvarasu S, Camattari A, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee H, Lee D: **Genome-scale metabolic reconstruction an in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement.** *Microbial Cell Factories* 2010:50–65.
28. Sohn SB, Graf AB, Kim TY, Gasser B, Maurer M, Ferrer P, Mattanovich D, Lee SY: **Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production.** *Biotechnology Journal* 2010, **5**:701–715.

29. Resina D, Bollok M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P: **Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:21.
30. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures.** *Journal of Biotechnology* 2005, **116**:321–335.
31. Lange HC, Heijnen JJ: **Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and bioengineering* 2001, **75**:334–44.
32. Egli T, Bosshard C, Hamer G: **Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern.** *Biotechnology and Bioengineering* 1986, **28**:1735–1741.
33. Trotsenko Y, Bystrykh L, Ubiyovk V: **Regulatory aspects of methanol metabolism in yeasts.** In *Microbial Growth on C1 compounds*. edited by Ed. Crawford RL and Hanson RS. ASM Press U1985.
34. Wolfgang B, Müüller R: **Mixed Substrate Utilization in Micro-organisms: Biochemical Aspects and Energetics.** *General Microbiology* 1985, **131**:39–45.
35. Resina D, Maurer M, Cos O, Arnau C, Carnicer M, Marx H, Gasser B, Valero F, Mattanovich D, Ferrer P: **Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter.** *New Biotechnology* 2009, **25**:396–403.
36. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A: **Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2011, **108**:1942–1953.
37. Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U: **Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:545–558.
38. Zhu T, Guo M, Zhuang Y, Chu J, Zhang S: **Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **89**:1127–1135.
39. Delic M, Mattanovich D, Gasser B: **Monitoring intracellular redox conditions in the endoplasmic reticulum of living yeasts.** *FEMS Microbiology Letters* 2010, **309**:61–66.
40. Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J: **Review of cellular metabolism.** In *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. 1998, **16**:22–76.
41. Lange HC, Eman MR, Van Zuijlen G, Visser D, Van Dam JC, Frank J, De Mattos MJ, Heijnen JJ: **Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **75**:406–415.

Introducció

En estudis previs portats a terme en aquest grup de recerca [1], es va fer servir la tècnica coneguda com marcatge fraccional biosintèticament dirigit (BDF) d'aminoàcids proteics amb la finalitat d'investigar el possible efecte ocasionat durant la producció d'una proteïna recombinant el subministrament de diferents concentracions d'una font de carboni mixta de glicerina/metanol a dues velocitats d'alimentació. Tot i que aquest estudi aporta noves perspectives sobre l'impacte de l'assimilació simultània d'un compost multi-carbonat juntament amb metanol, la utilització d'una mescla de carboni $C_3:C_1$ no va permetre la determinació de la distribució de fluxos a través del metabolisme central utilitzant restriccions derivades del marcatge ^{13}C . Per aquest motiu es va optar finalment per aplicar diferents simplificacions per realitzar els càlculs. Així doncs, la determinació de fluxos metabòlics utilitzant l'aproximació tradicional de relacions entre fluxos (METAFor)[2] comentada en el capítol anterior no es va poder aplicar donada de la insuficient informació de relacions de flux disponibles per la xarxa plantejada, el que deixava el sistema subdeterminat amb un grau de llibertat.

La utilització de substrats amb un nombre reduït d'àtoms de carboni usualment implica una disminució de la possible informació extreta mitjançant les diferents relacions de flux. En particular, les equacions desenvolupades al capítol anterior no són útils en aquest estudi ja que no és possible avaluar la contribució de la via de les pentoses al metabolisme central del llevat. En lloc de mirar de derivar una nova relació amb la finalitat de poder calcular la distribució de fluxos metabòlics, en aquest capítol es planteja com a metodologia alternativa el càlcul per mitjà un ajust global [3]. Aquesta alternativa consta de la simulació de les diferents distribucions d'isotopomers juntament amb el càlcul de les mesures esperades de marcatge ^{13}C , ajustant el valor dels diferents fluxos a les restriccions de marcatge i els diferents fluxos d'entrada i sortida del sistema estudiat. Aquest càlcul fou realitzat utilitzant el programa de simulació $^{13}CFlux2$ [4] el qual és una versió millorada del existent prèviament $^{13}CFlux$ [5]. Els diferents ajustos es varen portar a terme fet servir les mesures dels patrons de marcatge d'aminoàcids proteics obtingudes per experiments en continu amb barreges de glicerina/metanol[1].

A més a més es varen portar a terme nous experiments per tal de determinar la composició macromolecular i elemental de la biomassa a cadascuna de les condicions estudiades per tal de poder realitzar els càlculs finals de la forma més acurada possible.

Materials i mètodes

Soques i condicions de cultiu

Per la realització d'aquest estudi, es va seleccionar la soca X-33 de *P. pastoris* expressant una proteïna heteròloga de *Rhizopus oryzae* (Rol) sota el control transcripcional del promotor AOX1 [6]. Tots els experiments en continu realitzats foren alimentats amb medi mínim, definit prèviament en capítols anteriors [7]. Les diferents relacions de concentracions utilitzades foren 80-20, 60-40 i 40-60 en pes/pes de glicerina/metanol respectivament amb una suma total de font de carboni de 10 g.

Les condicions de cultiu utilitzades foren les descrites prèviament en [1]. Breument, el volum de treball utilitzat fou 1L en un bio-reactor (Applikon Biotechnology) de 3L de volum total operant a 30°C amb una concentració d'oxigen dissolt superior al 15% per tots els cultius mantinguda per mitjà d'un cabal d'aire d'1 vvm. El valor del pH fou constant a 5.5 controlat amb l'addició de KOH 1M. Totes tres combinacions de glicerina/metanol foren realitzades a dues velocitats d'alimentació 0.05h⁻¹ i 0.16h⁻¹, per sota de la velocitat específica màxima de creixement per *P. pastoris* amb metanol o glicerina com única font de carboni [8]. La sortida de gasos del bioreactor fou analitzada de la forma descrita en el capítol anterior.

Procediments analítics

Tots els procediments analítics per la determinació de la composició de biomassa i la concentració de metabòlits extracel·lulars foren realitzats tal i com s'explica en el capítol 2 Anàlisi de Biomassa. Tanmateix, tot el procediment de marcatge fraccional dirigit [1] és realitzat de la forma descrita en el capítol anterior a l'apartat de Marcatge Fraccional Biosintèticament Dirigit amb ¹³C.

Anàlisi de fluxos metabòlics mitjançant marcatge fraccional ¹³C

L'anàlisi de distribució de fluxos metabòlics amb restriccions ¹³C fou realitzat utilitzant el model metabòlic anteriorment descrit (capítol 3) amb petites modificacions tenint en compte la font de carboni utilitzada en aquest estudi (Apèndix 1.1). Totes les reaccions proposades en el model plantejat foren contrastades amb les vies biosintètiques proposades per *P. pastoris* [9]. Per al càlcul de tots els fluxos intracel·lulars, es va fer servir com a restricció les mesures extracel·lulars (entrades i sortides del sistema, producció de biomassa i formació d'arabitol) juntament amb els valors obtinguts per les diferents intensitats relatives dels aminoàcids proteics mitjançant metodologia NMR [1]. Així doncs, la distribució global de fluxos metabòlics és realitzada mitjançant un ajust iteratiu utilitzant el programa de simulació ¹³C Flux2 [4]. Breument, l'estructura de càlcul aplicada per el programa és representada en la Figura 1. on s'observen tres vies de càlcul per realitzar l'ajust final. Un cop construït el model d'acord amb les especificacions necessàries pel programa és realitzat un pas de revisió sintàctica, per detectar tots els errors tipogràfics del model. Seguidament s'utilitza una de les tres instruccions depenent del coneixement del nostre sistema i de la fiabilitat de les dades introduïdes. Si utilitzem "fwdsim"

es fan servir els valors assignats a les variables lliures per calcular la resta de variables sense optimització. Si utilitzem “sscanner” significa que no estem segurs del valor assignat a les variables lliures del model i desitgem que el programa ens faciliti un possible conjunt de valors per les variables que hem definit com a lliures i també ens indiqui si aquestes són les més adients per resoldre el model plantejat. Finalment, si utilitzem la instrucció “ssampler” significa que al igual que en la instrucció anterior no sabem el valor de les variables lliures, ara bé aquesta instrucció et dóna un conjunt aleatori de valors de partida per començar el procés d’iteració de les variables que nosaltres hem definit com a lliures. A continuació es realitza la instrucció “fitfluxes” la qual optimitza el valors dels fluxos per tal d’ajustar les intensitats relatives calculades (valors- f) a les introduïdes com a variable mesurada en el model. Finalment, mitjançant la instrucció “fwdsim -s” el programa simula per última vegada el model amb tots els paràmetres optimitzats juntament amb els seus errors pertinents.

Com a error experimental de les intensitats relatives mesurades s’utilitza un error absolut del 3%. D’acord amb la metodologia de càlcul anteriorment comentada es realitzaren 1000 iteracions utilitzant diferents conjunts aleatoris de valors inicials per la determinació final dels fluxos, per tal de minimitzar la possibilitat que la solució final fos un mínim local. El valor final de la distribució de flux seleccionada fou aquella que presenta un residual menor verificant que no fos possible una altra distribució alternativa amb el mateix residual amb una confiança del 5%.

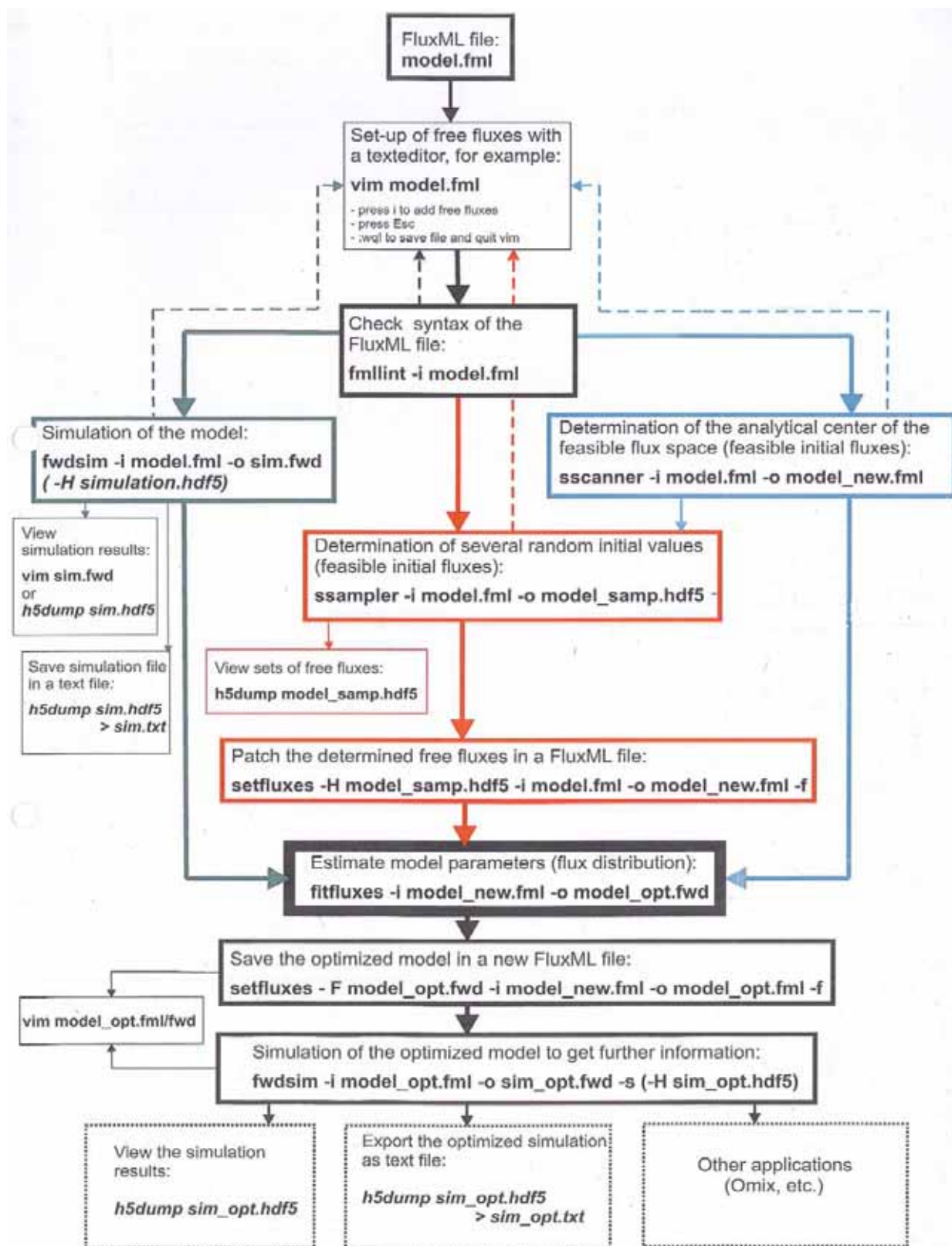


Figura 1. Representació esquemàtica del funcionament del programa de simulació ¹³CFlux2. Cadascuna de les possibles vies de càlcul està representada en un color diferent.

Càlcul de les taxes de regeneració de NADH i requeriments energètics

El càlcul de la generació de poder reductor fou realitzada a partir dels valors dels fluxos calculats tal i com es descriu en el capítol anterior. Seguint la mateixa premissa mencionada en el capítol 3 es porta a terme un balanç global d'electrons sense distingir el tipus de transportador (NADH o NADPH) incloent també un pas que representa la transferència dels electrons sobrants al oxigen (cadena respiratòria). Aquesta aproximació és equivalent a assumir que la totalitat del NADPH produït per el sistema fou consumit en reaccions biosintètiques o els seus electrons varen ser transferits de manera indirecta al NADH, mentre que la resta d'equivalents de reducció restants (NADH) foren introduïts a la cadena respiratòria per tal de esser reciclats. Això permet calcular un consum teòric d'oxigen per a totes les condicions d'estudi a partir dels fluxos metabòlics calculats prèviament. El resultat del valor d'oxigen calculat resulta estar al voltant del 90% del valor mesurat durant la realització dels experiments. Aquest fet que ens indica que, sota les condicions experimentals proposades, les variables calculades son altament consistents amb les obtingudes experimentalment.

Un cop l'activitat de la cadena de transferència d'electrons (respiració) ha estat calculada és també possible l'estimació del valor teòric de generació de l'ATP per part de la cèl·lula. Ara bé, això només és possible si es coneix valor de la relació P/O. En aquest treball un valor mig ponderat de 1.59 procedent de cadascuna de les relacions P/O calculades per experiments alimentats amb glicerina (1.6) o metanol (1.58) com a única font de carboni (comunicació personal del Luis Caspeta) fou utilitzat per realitzar els càlculs de requeriments energètics. Així doncs, el valor d'ATP calculat fou utilitzat com a referència per la comparació amb diferents resultats observats en la literatura [10] [11]. El valor del consum energètic per manteniment cel·lular fou calculat com la diferència entre el total produït menys el consumit en les diferents reaccions biològiques considerades. Els requeriments energètics per la formació de biomassa foren calculats de la forma descrita en la literatura [12] [13]. De manera breu, l'ATP necessari per la construcció de cada component macromolecular (proteïnes, carbohidrats, lípids, DNA i RNA) fou ponderat per el contingut mesurat de cada component en la biomassa total. Així doncs, per realitzar el càlcul és tingué en compte la majoria de monòmers i components en cadascuna de les fraccions macromoleculares juntament amb qualsevol cost energètic degut a la polimerització [12]. Per el càlcul del cost energètic de la síntesis de proteïnes es va emprar la composició aminoacídica mesurada en aquest treball. D'altra banda per la resta de fraccions macromoleculares s'utilitza la composició monomèrica prèviament publicada [14] i descrita en el capítol 2 d'aquest treball. Finalment l'ATP necessari per cada component macromolecular o síntesis de monòmer fou calculada com una suma algebraica del ATP total involucrat en el procés de síntesis prenent com a punt de partida el primer precursor en la via del metabolisme central [12].

Resultats i discussió

Creixement i producció de proteïna recombinant

Actualment no existeixen molts estudis on s'analitzi l'impacte ocasionat en el metabolisme central del llevat *P. pastoris* per la producció de proteïna recombinant, concretament en aquells on el producte desitjat es secretat al medi [15] [7]. Diferents objectius de producció així com la utilització de diferents combinacions de font de carboni originen una resposta metabòlica diferent. Seguint aquesta premissa la idea principal d'aquest estudi fou l'avaluació de l'impacte metabòlic ocasionat com a conseqüència del subministrament de diferents relacions de glicerina/metanol conjuntament amb diferents velocitats d'alimentació en una soca recombinant de *P. pastoris*.

Com a continuació dels experiments realitzats prèviament en aquest laboratori [1], noves replicues de cultius aeròbics foren realitzades amb l'objectiu principal d'obtenir totes les dades de composició de biomassa per tal d'avaluar el consum de substrat per la formació de biomassa i la producció de proteïna així com per validar les dades macroscòpiques obtingudes anteriorment sota idèntiques condicions. D'acord amb els experiments realitzats anteriorment, no s'observa acumulacions de substrat en cap de les condicions d'estudi operant amb la velocitat de creixement menor. En canvi, durant els experiments amb velocitat de creixement de 0.16h⁻¹ glicerina residual fou detectada en el medi, concretament l'experiment amb la relació més alta de glicerina/metanol (80:20) es varen detectar 2 g/l al final de l'experiment. Seguint en la mateixa línia, es va mesurar un consum reduït de metanol per aquesta relació de carboni concreta. D'altra banda, durant els experiments amb les altres dues relacions de carboni (60:40, 40:60 glicerina/metanol) es varen mesurar acumulacions de metanol de 2,6 g/L i 3,9 g/L respectivament, mentre que les concentracions de glicerina foren molt properes al límit de detecció de l'equip. Les velocitats de producció de CO₂ i consum de O₂ per quantitat de biomassa generada augmenten amb la fracció de metanol, contràriament al que s'observa amb el valor de RQ calculat (Taula 3, Apèndix 2).

Taula 1. Composició de Biomassa en C-mol i macromolecular per a cada condició avaluada. (A) Fórmula elemental de biomassa i (B) macromolecular per una soca recombinant de *P. pastoris* sota condicions de creixement amb diferents mescles de glicerina/metanol. C:N, relació Carboni Nitrogen; H:O, relació Hidrogen Oxigen; γ grau de reducció de la biomassa.

A

Glicerina/Metanol	Fórmula C-mol Biomassa	Relació C:N	Relació H:O	γ
80%_20% $\mu=0.16h^{-1}$	C _{1.658} H _{1.658} N _{0.140} O _{0.71} S _{0.006}	7.1	2.3	4.67
60%_40% $\mu=0.16h^{-1}$	CH _{1.787} N _{0.146} O _{0.701} S _{0.005}	6.9	2.5	4.73
40%_60% $\mu=0.16h^{-1}$	CH _{1.834} N _{0.137} O _{0.737} S _{0.003}	7.3	2.5	4.89
80%_20% $\mu=0.05h^{-1}$	CH _{1.682} N _{0.121} O _{0.624} S _{0.002}	8.3	2.7	4.8
60%_40% $\mu=0.05h^{-1}$	CH _{1.89} N _{0.137} O _{0.785} S _{0.012}	7.3	2.4	4.77
40%_60% $\mu=0.05h^{-1}$	CH _{1.784} N _{0.141} O _{0.658} S _{0.003}	7.1	2.7	4.77
80%Glucosa_20%Metanol $\mu=0.09h^{-1}$ *	CH _{1.784} N _{0.142} O _{0.658} S _{0.004}	7.1	2.7	4.81

* Dades procedents del capítol 2

B

Glicerina/Metanol	Proteïna pes/pes	Carbohidrat pes/pes	Lípids* pes/pes	RNA pes/pes	DNA pes/pes
80%_20% $\square=0.16h^{-1}$	0.39± 0.02	0.39 ± 0.03	0.02 ± 0.04	0.069 ± 0.004	0.002 ± 7e-4
60%_40% $\square=0.16h^{-1}$	0.42± 0.02	0.37 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.063 ± 0.002	0.002 ± 1e-4
40%_60% $\square=0.16h^{-1}$	0.37± 0.02	0.33 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.065 ± 0.001	0.002 ± 1e-4
80%_20% $\square=0.05h^{-1}$	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.06	0.09 ± 0.05	0.051 ± 0.003	0.009 ± 4e-3
60%_40% $\square=0.05h^{-1}$	0.38± 0.02	0.30 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.053 ± 0.001	0.002 ± 4e-4
40%_60% $\square=0.05h^{-1}$	0.43 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.044 ± 0.001	0.003 ± 7e-4

* Valors calculats

D'altra banda, les quantitats de CO₂ produït i O₂ consumit en els experiments a alta velocitat de creixement foren superiors que els produïts amb la menor velocitat. Aquest fet concorda amb la disminució observada del rendiment de biomassa respecte el total de font de carboni consumida per tots els experiments realitzats. A més, durant el transcurs dels experiments rèplica, es va mesurar la formació d'arabitol en els continus a velocitat de creixement alta (0.16h⁻¹) (Apèndix 2). Aquest fet, suggereix una possible explicació pel fet de que algunes dades macroscòpiques procedents dels experiments realitzats per A. Solà no complien (dins del marge de l'error experimental) el balanç màssic de carboni tal i com és comenta en diferents treballs on s'utilitzen dades d'aquest estudi [16][10]. Es dona el cas que quan es varen portar a terme aquells experiments es desconeixia la possibilitat de producció d'arabitol i no es va mesurar,. Per tal d'intentar resoldre aquesta inconsistència, i determinar la quantitat d'arabitol que s'hauria d'haver produït en aquells experiments, es va aplicar el procediment de reconciliació de dades en base a un balanç elemental tipus caixa negra, [17]. En aquests la formació d'arabitol es va incloure com a producte no mesurat.

Taula 2. Composició mitjana d'aminoàcids de la biomassa per *P. pastoris* X-33.

	Continus a $\square= 0.05 h^{-1}$		Continus a $\square= 0.16 h^{-1}$	
	Valor	Sd	Valor	Sd
ASx	9.9	0.3	9.1	0.2
THR	6.5	0.03	6.1	0.1
SER	6.4	0.1	6.3	0.1
GLx	13.7	0.6	15.8	0.4
PRO	5.1	0.2	4.6	0.1
GLY	7.9	0.3	7.5	0.1
ALA	8.6	0.1	10.2	0.8
VAL	5.7	0.1	5.5	0.1
CYST	0.4	0.3	0.1	0.01
MET	0.2	0.3	0.01	0.01
ILE	4.5	0.1	4.4	0.1
LEU	7.3	0.2	6.9	0.1
TYR	2.6	0.1	2.1	0.1

PHE	3.4	0.1	3.2	0.1
LYS	6.6	0.1	6.9	0.1
HIS	2.3	0.3	2.1	0.1
TRP	1.00	0.01	1.00	0.01
ARG	7.5	0.5	7.5	0.5

Composició mitjana en aminoàcids de la fracció proteica de la biomassa per a les diferents relacions de font de carboni utilitzades glicerina/metanol per les dues taxes de dilució. Els valors representen el percentatge de cada aminoàcid respecte el total.

Els resultats obtingut ens permeten avaluar la possible producció d'arabitol, a la vegada que en resulta una millora en l'índex de consistència per totes les condicions experimentals d'aquest estudi. Cal dir que la producció d'arabitol calculada solament va ser mesurable de ser significativa durant els experiments a alta velocitat de creixement ($0.16h^{-1}$) i aquest valor solament és rellevant per als casos de relacions de font de carboni 60:40 i 40:60 glicerina/metanol respectivament, valor del qual representa un 8.9% i un 5.4% del total de font de carboni consumida (Taula 3). A més a més, tots dos conjunts de dades macroscòpiques (replicats realitzats en aquest estudi i dades experimentals anteriors) foren comparades després dels diferents procediments de reconciliació i no es va observar diferències significatives entre els dos conjunts de dades (test t-Student amb 95% nivell de confiança). Així doncs, es va acceptar que la producció d'arabitol podria haver tingut lloc en els experiments anteriors de la mateixa forma que fou produït durant les rèpliques realitzades durant aquest estudi sota les mateixes condicions de cultiu.

Des del punt de vista del consum de carboni per la producció de biomassa, el nou conjunt de dades obtingut està d'acord amb els prèviament calculats [1] i segueixen la mateixa tendència. El rendiment de biomassa observat ($Y_{x/s}$) per les diferents condicions avaluades mostra una tendència negativa a mesura que la relació glicerina/metanol es redueix (Taula 3). El valor de rendiment mig per substrat consumit és més alt a alta velocitat de creixement (19%), tot i que és en aquesta condició on l'arabitol és produït. Aquest fet es pot explicar observant que a velocitat de creixement baixa es produeix quasi el doble de CO_2 per mol de carboni en biomassa (Apèndix 4) respecte als experiments amb una taxa de dilució elevada. Aquesta quantitat és quasi be el 50% més elevada que la suma de producció total de carboni procedent de CO_2 i arabitol conjuntament per mol de carboni de biomassa generada. Això explica la diferència observada en el rendiment. La diferència de rendiment és consistent també amb el fet de que la quantitat de metanol directament desassimilada cap a la formació de CO_2 per mol de carboni de biomassa és més elevada (sobre el 45%) a la velocitat de creixement baixa (Apèndix 4).

Les condicions de cultiu tenen un impacte significatiu en la relació dels components de formació de la biomassa així com en els precursors necessaris procedents del metabolisme central, els quals son altament rellevants en qualsevol càlcul de flux. En conseqüència tant la composició elemental com la macromolecular de cadascuna de les rèpliques realitzades (Taula 1) (incloent la composició amino-acídica (Taula 2)) fou analitzada per tal d'obtenir la composició exacta de *P. pastoris* creixent sota condicions de co-assimilació amb glicerina/metanol.

Tal i com és pot observar en la composició elemental (Taula 1), la relació C:N, en experiments amb velocitat de creixement baixa, s'incrementa al augmentar la relació glicerina/metanol mentre que el grau de reducció és manté estable. D'altra banda en experiments a alta velocitat de creixement el grau de reducció tendeix a decreixer amb l'increment de la relació

glicerina/metanol. Aquests canvis son un reflex del canvi en la composició macromolecular de la biomassa.

Des del punt de vista de composició macromolecular, els experiments a baixa velocitat de creixement mostren una disminució en el contingut proteic mentre que la composició de carbohidrats i àcids nucleics augmenta amb l'increment de la relació glicerina/metanol, el que està estretament relacionat amb l'increment de la relació C:N comentada anteriorment. De la mateixa forma el comportament observat als experiments a alta velocitat de creixement semblen indicar una tendència similar. Observant els valors de RNA i carbohidrats obtinguts per totes dues velocitats d'alimentació a velocitats elevades s'obtenen valors més elevats. Ara bé, tenint en compte totes les incerteses relacionades en aquests càlculs la majoria de les diferències observades no son estadísticament significatives. Així doncs, no s'observen diferències significatives (95% d'índex de confiança) en la composició macromolecular per els diferents experiments realitzats en aquest estudi utilitzant una font de carboni mixta glicerina/metanol a igual velocitat de creixement.

D'altra banda, d'acord amb l'anàlisi de la composició d'aminoàcids realitzada, sembla que alguns aminoàcids (Asp, Thr, Glu, Pro, Ala, Tyr, Phe, Lys, a p-valors < 0.05) difereixen significativament entre les diferents velocitats de creixement avaluades (Taula 2). Amb aquesta observació i tenint en compte la importància de la composició de biomassa per el càlcul de les diferents distribucions de fluxos, es va decidir, utilitzar una composició mitjana per a cada velocitat específica de creixement (Taula 1A).

En termes d'activitat enzimàtica específica extracel·lular de la lipasa produïda, s'observa una clara diferència entre totes dues velocitats d'alimentació per totes tres relacions de carboni utilitzades, productivitats més elevades s'observen a baixa velocitat de creixement (Apèndix 3). Inesperadament, per totes dues velocitats d'alimentació, la menor activitat mesurada fou durant els experiments amb relació 60-40 % glicerina/metanol. Aquesta peculiaritat pot ser deguda al complex mecanisme de producció de proteïna recombinant el qual pot tenir variacions depenent de les condicions del nostre sistema [18] com poden ser la relació concreta entre fonts de carboni o simplement qualsevol variació en les condicions del nostre sistema que repercuteixi en la quantitat total de proteïna produïda. Tanmateix, com la producció de lipasa no fou mesurada durant els experiments previs realitzats per A. Solà, els valors mesurats poden ser comparats amb els obtinguts en el capítol anterior sota condicions de creixement glucosa/metanol 80-20 % (2504 ± 192 UA/g_{DCW}) utilitzant la soca X-33 Rol_1 a velocitat de creixement de 0.09h^{-1} . En el present estudi per una relació de font de carboni 80-20 % glicerina/metanol a una velocitat de creixement de 0.05h^{-1} fou mesurat un valor de 2316 ± 88 UA/g_{DCW}, suggerint que la utilització de glucosa/metanol com a font de carboni mixta pot ser més convenient per la producció de proteïna recombinant. Cal dir però que es necessiten experiments addicionals amb la mateixa velocitat de creixement per confirmar aquesta hipòtesis.

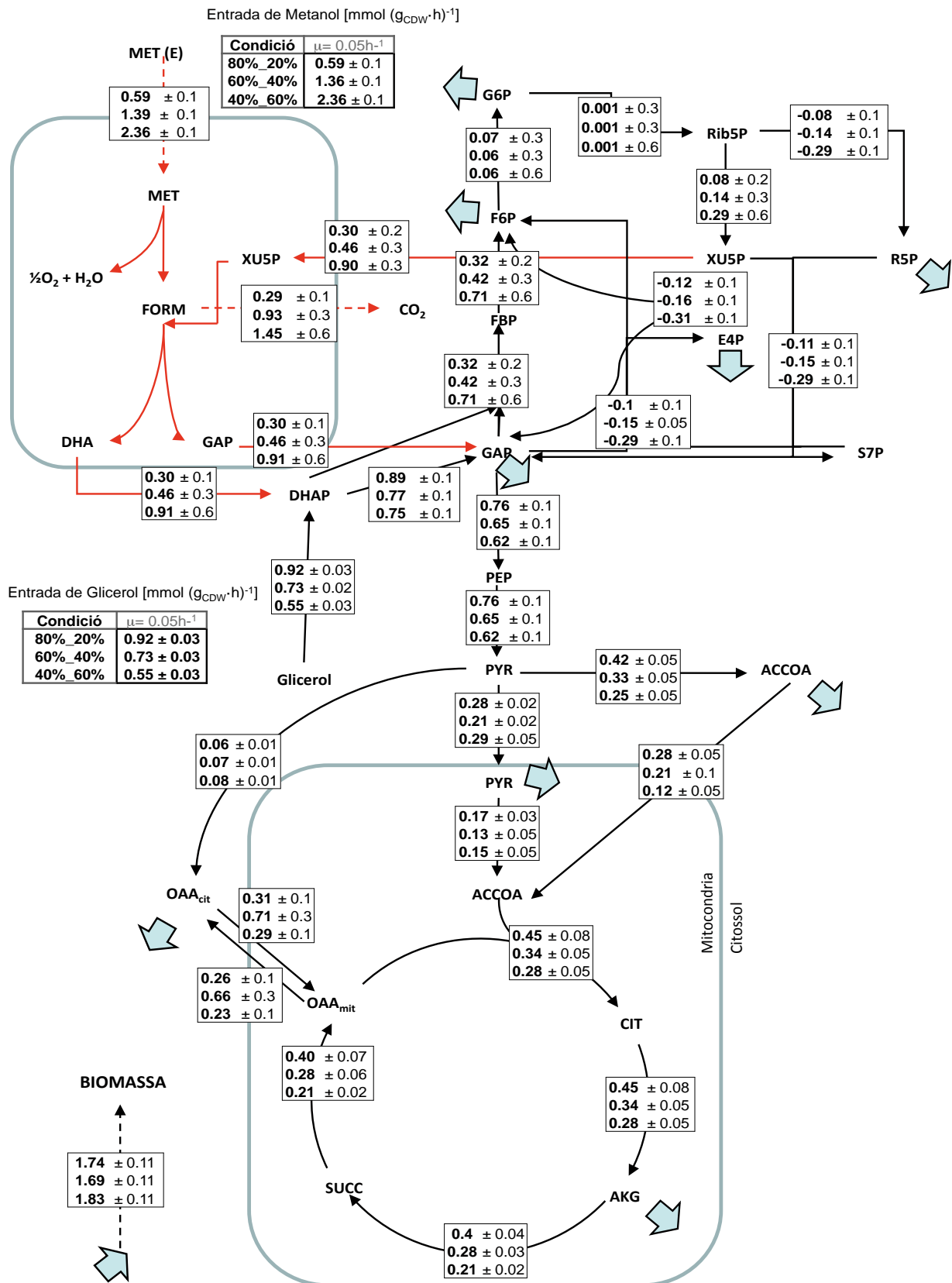


Figura 1. Distribució de flux metabòlic sota condicions de creixement amb diferents relacions de font de carboni glicerina/metanol a una velocitat de creixement de $\mu = 0.05h^{-1}$. Activitats de l'enzim màlic així com de la via del glixilat no foren introduïdes en el càlcul de la distribució de fluxos calculada

Capítol 4

Taula 3. . Visió general dels paràmetres de creixement macroscòpics de la soca X-33 de *P. pastoris* sota condicions de creixement amb diferents relacions de mescles de glicerina/metanol, dades reconciliades [1].

	Glicerina mmol/(g _{DCW} ·h)	Metanol mmol/(g _{DCW} ·h)	Arabitol mmol/(g _{DCW} ·h)	OUR mmol/(g _{DCW} ·h)	CER mmol/(g _{DCW} ·h)	Biomassa mmol/(g _{DCW} ·h)	RQ	**Y _{x/s} (g _{DCW} /g)
80%_20% m=0.05h ⁻¹	-0.92 ± 0.04	-0.59 ± 0.07	0	-2.35 ± 0.13	1.62 ± 0.11	1.74 ± 0.11	0.69 ± 0.17	0.51 ± 0.06
60%_40% m=0.05h ⁻¹	-0.73 ± 0.04	-1.47 ± 0.07	0	-3.06 ± 0.15	1.95 ± 0.13	1.69 ± 0.11	0.64 ± 0.19	0.44 ± 0.11
40%_60% m=0.05h ⁻¹	-0.55 ± 0.03	-2.41 ± 0.07	0	-3.65 ± 0.15	2.20 ± 0.13	1.83 ± 0.11	0.60 ± 0.19	0.39 ± 0.08
80%_20% m=0.16h ⁻¹	-2.53 ± 0.3	-0.18 ± 0.03	*0.003 ± 0.27	-4.78 ± 0.21	3.25 ± 0.16	4.54 ± 0.85	0.68 ± 0.25	0.60 ± 0.14
60%_40% m=0.16h ⁻¹	-2.61 ± 0.63	-1.76 ± 0.27	*0.17 ± 0.44	-5.35 ± 0.47	3.09 ± 0.48	5.63 ± 0.35	0.58 ± 0.62	0.50 ± 0.13
40%_60% m=0.16h ⁻¹	-2.22 ± 0.45	-2.58 ± 0.51	*0.1 ± 0.3	-5.73 ± 0.27	3.33 ± 0.16	5.44 ± 0.85	0.58 ± 0.31	0.53 ± 0.15

* Valors calculats, ** Rendiment experimental previ al pas de reconciliació

Mesures reconciliades del consum de substrat, biomassa i les taxes de producció de metabòlits per a cada condició de cultiu. Índex de consistència h per sota de 5 (nivell de confiança del 95%) per tots els casos.

Taula 4. Visió general dels paràmetres energètics de la soca recombinant de *P. pastoris* sota condicions de creixement amb diferents relacions de font de carboni glicerina/metanol durant cultius amb estat estacionari.

mmol/(g _{DCW} ·h)	80_20 □=0.05 h ⁻¹		60_40 □=0.05 h ⁻¹		40_60 □=0.05 h ⁻¹		80_20 □=0.16 h ⁻¹		60_40 □=0.16 h ⁻¹		40_60 □=0.16 h ⁻¹	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
ATP total generat	8.8	0.7	8.7	0.9	9.3	1.8	18.4	0.5	17.8	0.6	17.4	1.1
ATP Fosforilació oxidativa	6.5	0.7	7.1	0.9	7.8	1.8	14.8	0.5	14.0	0.6	13.7	1.1

Impacte de la relació glicerina/metanol en la distribució de fluxos metabòlics

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en experiments previs [1] no fou possible l'anàlisi de distribució de fluxos metabòlics degut a la limitada informació disponible. Les dades de biomassa obtingudes en el present treball juntament amb la disponibilitat recent del programa de càlcul ¹³CFlux2 ens a permès el càlcul de la distribució de fluxos metabòlics com una solució global. Com que les condicions experimentals van ser idèntiques i les mesures experimentals son comparables per els dos conjunts d'experiments es va assumir que la composició de biomassa obtinguda procedent dels experiments rèplica és representativa per els experiments realitzats per A. Solà. També, es va assumir que la producció d'arabitol era un component extracel·lular necessari per completar alguns dels balanços de carboni dels diferents experiments previs. Així doncs, tenint en compte aquestes dues premisses, les dades de marcatge proteic ¹³C-NMR juntament amb les dades de fluxos extracel·lulars reconciliades incloent arabitol foren utilitzades per realitzar el càlcul de distribució de fluxos.

Els valors dels diferents fluxos metabòlics calculats en aquest estudi és mostren en la Figura 1 i Figura 2 respectivament. A més a més, algunes relacions de fluxos entre diferents branques de la xarxa metabòlica foren calculades (Taula 7) i comparades amb les descrites anteriorment calculades a partir de les observacions directes del marcatge ¹³C d'aminoàcids proteics [1]. Encara que els resultats no mostren diferències estadísticament significatives, tenint en compte l'error experimental, el camí seguit per realitzar el càlcul fou diferent al utilitzat anteriorment ja que aquí s'utilitza el valor del flux de carboni a través d'aquestes vies en lloc de la relació de marcatge ¹³C per calcular aquestes relacions. D'altra banda, el valor final dels diferents fluxos ens permet la identificació de canvis limitats però estadísticament significatius entre les diferents relacions de carboni utilitzades mentre que s'observen diferències més acusades entre les dues velocitats d'alimentació proposades.

En primer lloc, la quantitat total de carboni consumida per el sistema (glicerina + metanol) disminueix al augmentar la velocitat de creixement per la producció de la mateixa quantitat de biomassa (Apèndix 4) (augment del rendiment). En segon lloc, observant els experiments a la mateixa velocitat de creixement una disminució de la relació glicerina/metanol resulta en la disminució en l'entrada de glicerina a la cèl·lula mentre que l'assimilació de metanol es veu augmentada. D'altra banda, la quantitat total de carboni consumida per totes dues vies d'entrada augmenta amb la velocitat de creixement i reflexa un comportament contrari respecte la relació glicerina/metanol (Apèndix 4). Aquest comportament pot ser interpretat con a indicatiu de que l'energia útil extreta per cada mol de carboni consumit de glicerina o de metanol es diferent. El carboni assimilat per les dues vies d'entrada es concentra en el GAP on posteriorment és ramifica cap a les diferents vies del metabolisme central (glicòlisis, PPP, PEP i TCA). El flux que circula a través de la gluconeogènesi i la ruta de les PPP pot ser estimat com la diferència entre la totalitat de flux que arriba a GAP menys el flux de sortida d'aquest pool cap a PEP (tenint en compte que el consum dels diferents metabòlits intermediaris per a producció de biomassa és significament menor que el flux net que circula a través de la via, aquest es pot considerar constant per la mateixa velocitat de creixement). En conseqüència, es pot observar que en el moment en que la velocitat de creixement augmenta, el flux que circula per aquestes branques també es veu augmentat. D'altra banda, observant els experiments amb la mateixa velocitat de creixement, la distribució de carboni de la xarxa metabòlica descrita segueix un

perfil diferent depenent de la relació glicerina/metanol escollida. Així doncs, els experiments a baixa μ , la contribució relativa del metanol i glicerina cap a les diferents vies (gluconeogènesi, PPP) és veu incrementada amb la disminució de la relació de carboni mencionada anteriorment. Contràriament, a altes velocitats de creixement la contribució del metanol i la glicerina a aquestes dues vies metabòliques disminueix en paral·lel amb aquesta relació de substrats. Seguint el mateix perfil, la contribució de la branca de les PPP (Xul5P) cap a la via d'assimilació de metanol fou completament diferent per les dues velocitats de creixement utilitzades, mostrant un augment d'aquets flux a mesura que la relació de carboni glicerina/metanol augmenta i una disminució d'aquesta contribució en paral·lel, amb la disminució d'aquesta, per el cas de baixa i alta velocitat de creixement respectivament. Per tant, els canvis en la relació de distribució de flux a l'altura de GAP semblen el resultat de la diferent activitat del enzim dihidroxiacetona sintasa el qual pot ser considerat com el coll d'ampolla per la incorporació del metanol consumit (via formaldehid) cap al metabolisme central del llevat. D'altra banda aquest increment en la contribució de la via de les PPP cap a l'assimilació de metanol pot ser observada d'una forma directa en el valors mesurats procedents de l'anàlisi ^{13}C d'aminoàcids proteics (valors- f , Phe- α) tal i com és menciona en treballs previs [1]. Aquest comportament pot ser directament comparat amb el flux dirigit cap a la formació de CO_2 a través de formaldehid i posteriorment format (Figura 1, Figura 2) amb la conseqüent generació simultània de 2 mols de NADH per mol de metanol consumit. Així doncs, podem observar que per totes dues velocitats de creixement, una reducció en la fracció glicerina/metanol ocasiona un augment del metanol directament desassimilat cap a CO_2 . Tanmateix, mentre a baixa velocitat aquesta desassimilació augmenta gradualment des d'un 40% fins un 60% del metanol consumit a velocitat de creixement alta la pràctica totalitat del metanol consumit és directament desassimilat cap a CO_2 en dues de les relacions proposades i totalment incorporat al metabolisme central per el cas on la relació glicerina/metanol és més alta. Aquest fet ens suggereix que la quantitat de metanol directament assimilada cap al metabolisme central pot està relacionada amb la velocitat d'entrada de glicerina al sistema. Resulta interessant que la quantitat de CO_2 desassimilada per unitat de biomassa produïda és superior a baixa velocitat de creixement quant comparem la mateixa relació de font de carboni (glicerina/metanol) subministrada al sistema i aquesta augmenta amb la fracció de metanol a l'aliment (Apèndix 4).

Si ens fixem en el flux a través del cicle dels àcids tri-carboxílics (TCA), relatiu a la biomassa produïda, aquest es veu disminuït al reduir la quantitat de glicerina en l'aliment per el cas de μ baixa mentre que roman pràcticament constant per el cas de μ alta, no mostrant diferències estadístiques amb una confiança del 95% entre els resultats obtinguts. D'altra banda, des d'un punt de vista global l'activitat relativa del TCA per la producció de la mateixa biomassa és inferior a velocitats de creixement alta podent ser un indicador que l'activitat d'aquest cicle tendeix a generar menys equivalents de reducció a velocitats elevades properes a μ_{max} . Per aquest cas, la generació d'equivalents de reducció produïts per el pas directe de desassimilació de metanol cap a CO_2 sembla compensar la disminució d'activitat del TCA. Aquesta suposició és coherent amb el fet de que a baixa velocitat de creixement, l'activitat relativa del TCA disminueix mentre que la desassimilació directa cap a CO_2 és veu augmentada amb la disminució de la relació glicerina/metanol.

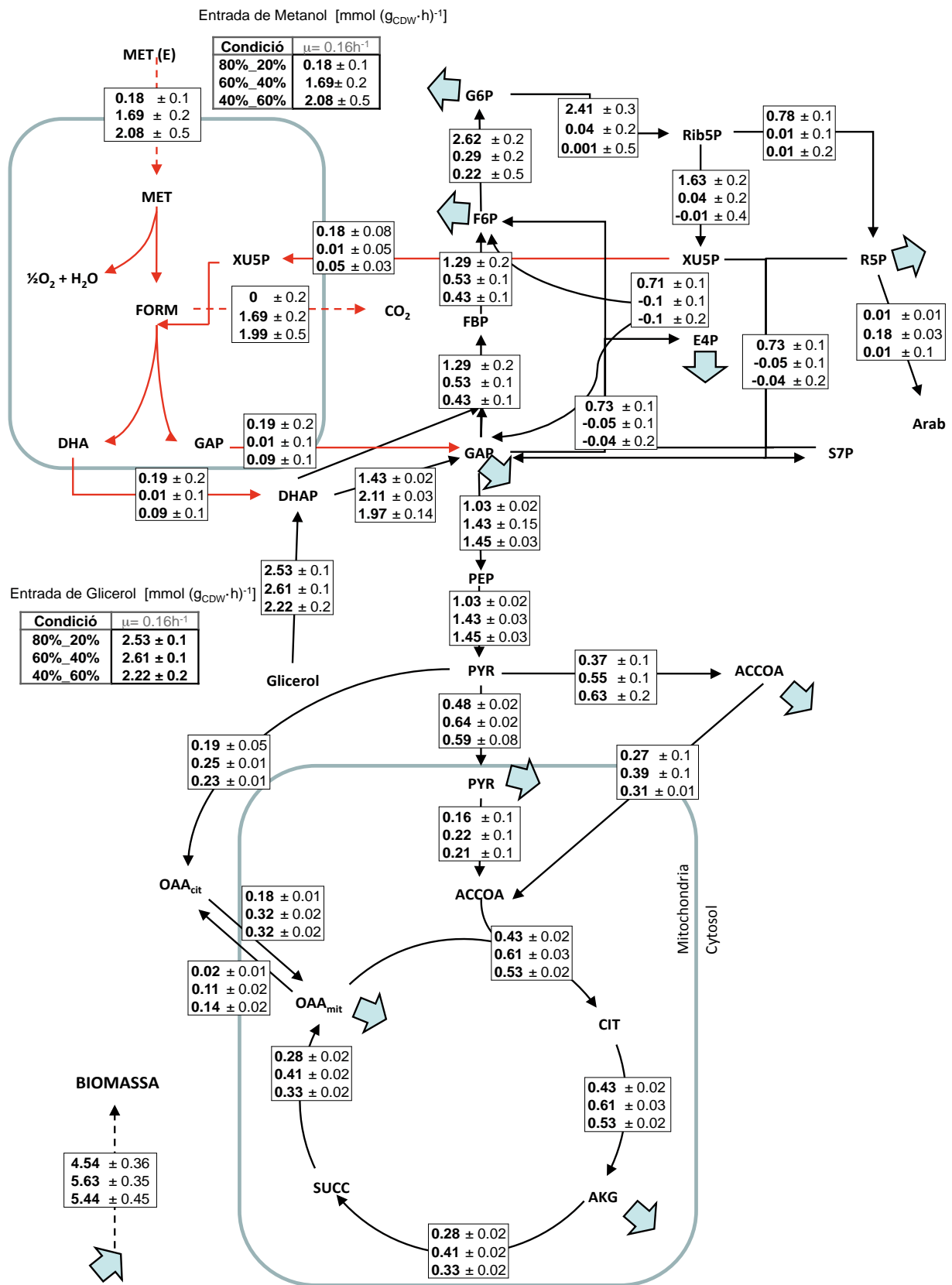


Figura 2. Distribució de flux metabòlic sota condicions de creixement amb diferents relacions de font de carboni glicerina/metanol a una velocitat de creixement de $\mu = 0.16\text{h}^{-1}$. Activitats de l'enzim màlic així com de la via del glixilal no foren introduïdes en el càlcul de la distribució de fluxos calculada.

itats teòriques d'ATP per a la síntesis de 1gr de biomassa sota les condicions de creixement d'aquest estudi amb cultius en contin

	$\mu = 0.05h^{-1}$ Glicerina/ Metanol			$\mu = 0.16h^{-1}$ Glicerina/ Metanol		
	80%_20%	60%_40%	40%_60%	80%_20%	60%_40%	40%_60%
Y_{XATP} mmol ATP/g _{DCW}	28.3	30.1	28.8	30.2	32.3	30.4

itat total d'ATP que s'ha de sintetitzar per al creixement cel·lular sota les condicions de creixement en aquest estudi amb cultius en [11]

	80%_20%		60%_40%		40%_60%	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
Y_{XATP} mmol ATP/g _{DCW}	87.9	4.8	82.8	5.6	74.3	11.1

aració entre les relacions metabòliques entre els diferents compartiments cel·lulars sota les condicions de creixement en aquest esti

	80_20 $\mu=0.05h^{-1}$		60_40 $\mu=0.05h^{-1}$		40_60 $\mu=0.05h^{-1}$		80_20 $\mu=0.16h^{-1}$		60_40 $\mu=0.16h^{-1}$		40_60 $\mu=0.16h^{-1}$	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
ció total del pool %												
λ_{cyt} provinent PYR _{cyt}	18.8	5.3	9.3	10.4	24.9	6.4	90.5	12.4	69.4	4.5	63.0	4.1
λ_{mit} provinent PEP	43.7	26.2	71.4	65.7	57.4	48.1	39.1	18.1	44.4	16.1	49.6	19.1
λ_{cyt} provinent PYR _{cyt} (*)	28.0	4.0	35.0	2.0	33.0	3.0	89.0	2.0	78.0	2.0	76.0	2.0
λ_{mit} provinent PEP (*)	32.0	3.0	36.0	3.0	29.0	4.0	47.0	2.0	42.0	2.0	43.0	2.0

presentat en el treball anterior [1]

D'acord amb els patrons de marcatge descrits en treballs anteriors [1] en aquest cas tampoc es va observar diferències significatives entre OAA_{cyt} i OAA_{mit} , ja que tots dos metabòlits resulten idènticament marcats al finalitzar el càlcul de les diferents distribucions de fluxos. Aquesta igualtat en la marca ens indica que existeix un elevat flux d'intercanvi entre tots dos pools. D'altra banda, el flux net calculat procedent del citosol cap a OAA_{mit} fou estadísticament diferent per les diferents velocitats d'alimentació proposades, mostrant un increment en l'intercanvi de flux entre aquest dos pools a μ alta. Aquest fet ens indica que, independentment de la fracció de metanol en el medi del continu i a mesura que la cèl·lula s'apropa a la seva μ_{max} de creixement, existeix un flux net d'OAA provinent del citosol cap a la mitocòndria. Tenint en compte aquesta observació conjuntament amb el fet comentat anteriorment sobre la disminució de l'activitat relativa del TCA a velocitats d'alimentació alta (Apèndix 4), ens indica que el flux global en el TCA dedicat a la producció de precursors per a la formació de biomassa, augmenta mentre el flux global dedicat a la producció d'equivalents de reducció en forma de NADH és veu disminuït. Aquest comportament és coherent amb el fet prèviament mencionat sobre la desassimilació de metanol cap a CO_2 que augmenta amb la μ , el qual ens genera NADH, així com també és coherent amb l'augment relatiu del flux procedent del citosol cap a la mitocòndria a nivell d'OAA per completar la ja coneguda via anapleròtica. Finalment el fet d'observar la producció d'arabitol a velocitat de creixement alta, ens pot indicar que existeix un excés de disponibilitat de metabòlits intermediaris oxidats ja que l'arabitol és un metabòlit menys reduït dels dos substrats utilitzats. Així doncs, hom pot suposar que la velocitat a la qual tots dos substrats utilitzats son consumits és superior a la velocitat a la qual aquets poden ser utilitzats per la generació de biomassa ja que aquesta velocitat és pròxima a la μ_{max} . Aquest podria ser aprofitat per la cèl·lula per a la producció de substrats addicionals de més alta qualitat que podrien ser utilitzats en el moment en que els altres dos fons de carboni fossin totalment consumits per la cèl·lula.

Generació d'equivalents de reducció NADH i NADPH

Els valors de NADH generats van ser calculats per mitjà de l'estequiometria de la ret plantejada juntament amb els fluxos calculats per a cadascun dels diferents casos d'estudi. Els resultats ens mostren dos rangs clarament diferenciats per les dues velocitats d'alimentació utilitzades, 4.1-4.9 mmol/(g_{DCW}·h) per μ baixa i 8.6-9.3 mmol/(g_{DCW}·h) per el cas a μ alta respectivament (Taula 4). Assumint que l'excés d'equivalents de reducció, es recicla a través de la cadena respiratòria l'oxigen teòric consumit es pot calcular per cada condició. Els valors obtinguts representen entre el 95-100% del qO_2 reconciliat, indicant que s'ha proposat un balanç d'electrons adequat per la ret plantejada.

Un cop validat el balanç global d'electrons, es va calcular els requeriments de NADPH necessaris per biosíntesis en cèl·lules sota condicions de creixement amb substrats mixtes mostrant un valor al voltant de 1.3 mmol/g_{DCW}·h per totes les condicions d'estudi. El flux a través de la branca oxidativa de les PPP està generalment relacionat amb la producció de NADPH per la formació de biomassa quant s'utilitza glucosa com única font de carboni[19]. Tanmateix en aquest estudi, els resultats ens mostren que assumint aquesta hipòtesis, en el moment d'utilitzar barreges de glicerina/metanol com a font de carboni, el flux a través d'aquesta branca és pràcticament negligible en la majoria de condicions avaluades. D'altra

banda, possibles reaccions productores de NADPH com ara la piruvat deshidrogenasa o la isocitrat deshidrogenasa no mostren un flux de carboni suficient per poder compensar els requeriments globals de NADPH. Aquest fet ens suggereix que hi ha d'haver altres reaccions generadores de NADPH. És interessant observar que alguns llevats "crafter-negatius" mostren diferents mecanismes involucrats en la interconverció entre NADPH i NADH. Existeixen diferents llançadores involucrades en seqüències de reaccions que donen com a resultat l'intercanvi de cofactors redox entre el citosol i la mitocondria [20][21]. D'altra banda tenint en compte que en aquest estudi s'ha utilitzat la glicerina com una de les fonts de carboni, el cicle de la DHA (cicle de la glicerina dihidroxiacetona) podria ser un dels candidats més idonis per realitzar aquesta conversió en el llevat de *P. pastoris*, de la mateixa forma que ha estat proposat per *S. cerevisiae* [22]. Aquesta llançadora re-oxida el NADH citosòlic via la glicerina-3-fosfat-desidrogenasa i posteriorment genera NADPH citosòlic via la glicerina-deshidrogenasa amb el consum de una molècula de ATP. Així doncs la demanda de NADPH pot ser compensada per l'activitat del cicle de la DHA.

Un altra possibilitat a tenir en compte podria ser la via de detoxificació del formaldehid, els enzims involucrats en aquest pas poden utilitzar NADH⁺ o NADP⁺ com acceptor d'electrons. En aquest cas, una possibilitat semblaria ser l'enzim S-(hidroximetil)glutatió deshidrogenasa (EC:1.1.1.284). aquest enzim catalitza la conversió de S-(hidroximetil) glutatió en S-formil glutatió, seguidament convertit en format per l'acció de l'enzim S-formil glutatió hidrolasa (EC:3.1.2.12). Així doncs, aquets pas pot ser un altra possible font de producció de NADPH quant existeix una producció de formaldehid i NADP⁺ com sembla ser en aquest cas.

Requeriments energètics

Tal i com s'ha explicat més amunt, els requeriments biosintètics d'ATP per unitat de biomassa foren estimats tenint en compte la composició macromolecular de la biomassa (Taula 1), així com la composició de proteïnes i aminoàcids (Taula 2) determinades en aquest treball. També es va assumir que la resta de components macromoleculars estaven presents en proporcions similars a les presentades en treballs anteriors [14] (veure material i mètodes per detalls concrets). Les diferents tasses de generació d'ATP per *P. pastoris* en les condicions experimentals d'aquest estudi és mostren a la Taula 4. Concretament, la generació d'ATP a través de la fosforilació a nivell de substrat fou calculada mitjançant la estequiometria de la xarxa metabòlica. La resta d'ATP necessari es va assumir que era proporcionat per la cadena de transferència d'electrons. Els resultats ens mostren que la fracció generada a través de la respiració (fosforilació oxidativa), per satisfer la demanda d'ATP fou sobre el 75-80% del total generat per la cèl·lula per totes les condicions de cultiu estudiades. A més a més, els requeriments per el manteniment cel·lular (energia no associada al creixement), fou estimat de ésser entre 4 -5 mmolATP/g_{DCW}.h per el cas de baixa velocitat de creixement i entre 8-10 mmolATP/g_{DCW}.h per el cas d'alta velocitat de creixement. La eficiència de la fosforilació oxidativa, és a dir la relació de P/O, fou definida per totes les condicions com a 1.59 molATP/molO com a mitjana dels valors independents de P/O calculats per a glicerina i metanol comentada anteriorment. En aquest estudi es va calcular una generació d'ATP global entre 71-83 mmolATP/g_{DCW} per les diferents relacions de font de carboni avaluades (Taula 7). Els resultats obtinguts ens mostren una tendència decreixent per la generació d'ATP amb la disminució de la relació de font de carboni glicerina/metanol. El que

podria explicar la disminució en el rendiment de biomassa al disminuir la relació de fonts de carboni. Aquesta tendència difereix dels valors simulats presentats en el treball de Caspeta [11] on s'observa una tendència oposada amb la disminució d'aquesta relació en l'aliment d'entrada, ara bé aquestes diferències no son estadísticament significatives i es precisaria d'experiments més detallats per confirmar aquestes tendències.

D'altra banda, es varen calcular els paràmetres teòrics energètics (Y_{ATP}) per la síntesi de biomassa (Taula 5) mostrant valors molt similars per totes dues velocitats d'alimentació; i aquests es troben estretament relacionats amb els presentats en treballs anteriors. Aquets resultats indiquen que les característiques energètiques del llevat *P. pastoris*, sota condicions de creixement on s'utilitzen diferents relacions de glicerina/metanol com a font de carboni, son altament comparables amb diferents estimacions prèvies per llevats per exemple els valors de Y_{ATP} calculats per el cas del llevat *S. Cerevisiae* [13] utilitzant glucosa com única font de carboni.

Tenint en compte que la síntesi de la proteïna heteròloga és molt més elevada a baixes velocitats de creixement (Appendix 2) i que dins d'aquesta velocitat es produeixen quantitats similars de proteïna i d'ATP pels experiments amb diferents relacions de font de carboni, hom diria que la producció de proteïna recombinat requereix una quantitat similar de generació d'ATP (Taula 4.) en les diferents condicions de relació de carboni i que per tant aquesta relació no té un impacte en els requeriments energètics. Si bé en el cas de 60-40 % glicerina/metanol sembla detectar-se una generació menor d'ATP i també una menor síntesi de proteïna recombinant. En tot cas, aquets fets serien només indicacions preliminars i es precisaria de nous experiments en aquesta condició per corroborar aquestes dades.

Conclusions

En el marc d'aquest estudi, es va portar a terme un nou conjunt de dades en cultius de *P. pastoris* sota condicions de diferents relacions de carboni glicerina/metanol i amb diferents velocitats d'alimentació. Aquest conjunt de dades ha permès per una banda la validació de dades prèviament presentades i per l'altra, l'obtenció d'una composició de biomassa per a diferents condicions de treball així com diferents nivells d'expressió de proteïna recombinant no mesurada en el treball anterior. La nova composició de biomassa descrita en aquest estudi juntament amb les dades de marcatge ¹³C BDF d'aminoàcids ha permès el càlcul de la distribució de fluxos metabòlics a través del sistema de carboni central de *P. pastoris* no descrit fins ara per cultius amb continu utilitzant substrats mixtes glicerina/metanol. Les diferents distribucions de fluxos calculades ens permet realitzar un anàlisi del comportament d'una soca recombinant fent servir diferents relacions de font de carboni així com per a dues velocitats de creixement, mostrant distribucions de flux diferents segons la condició avaluada.

La composició macromolecular mesurada, mostra diferències entre les dues velocitats de creixement utilitzades mentre que l'impacte ocasionat per les diferents relacions de carboni utilitzades és pràcticament negligible. Aquest és el cas de la composició aminoacídica mesurada per la biomassa. Per aquest motiu es va fer servir dues composicions diferents (□ alta i □ baixa) per el càlcul de les diferents distribucions de fluxos.

L'impacte de la velocitat de creixement en la distribució de fluxos metabòlics es pot resumir com:

- Durant els experiments a velocitat de creixement alta és produït arabitol el qual està menys reduït que els substrats alimentats.
- La biomassa produïda per quantitat de carboni consumida és inferior a μ baixa que a μ alta i aparentment disminueix amb l'augment de metanol residual en el medi. Això es així malgrat que s'observa la producció d'arabitol a velocitat de creixement elevada.
- Existeix un impacte rellevant en la via d'assimilació de metanol, mostrant clares diferències entre les diferents taxes de dilució, com ara pel cas de μ baixa, on l'increment de la fracció de metanol incrementa la fracció directament desassimilada cap a CO_2 , mentre que a velocitat de creixement alta la pràctica totalitat del metanol consumit és desassimilat a CO_2 a fraccions de metanol elevades.
- Les diferents relacions de glicerina/metanol a una taxa de dilució determinada mostren petites variacions en la distribució de fluxos calculada. A mesura que la fracció de metanol augmenta en el cas de μ baixa el flux relatiu del cicle del TCA cap a la producció de biomassa disminueix, mentre que a μ alta pràcticament roman constant. Un comportament anàleg es pot observar en la contribució anapleròtica del OAA cap al TCA.
- Els resultats obtinguts ens indiquen que un increment en la desassimilació cap a CO_2 per la via directa a partir del formaldehid té com a resultat un increment en la generació de NADH. Això podria explicar els diferents efectes observats com ara la disminució de l'activitat del TCA, la generació de NADPH a partir de NADH o la producció d'arabitol.
- Les diferents dades de distribucions de fluxos i de composició de biomassa obtingudes, ens ha permès el càlcul de la generació de NADH, NADPH i els requeriments energètics de la cèl·lula. Globalment els paràmetres obtinguts són coherents amb els calculats per altres llevats. La insuficient quantitat de NADPH generada per la via de les pentoses fosfat, suggereix la possibilitat de l'existència de vies alternatives per la síntesis de NADPH a partir de NADH.

En resum, aquest estudi representa el punt de partida de l'estudi del comportament de *P. pastoris* sota diferents condicions d'operació. En particular de l'efecte de la relació de font de carboni mixta com a variable per l'optimització de diferents procediments de cultiu, en particular aquells que utilitzem metanol com a font de carboni alternativa. D'altra banda, la informació extreta en aquest treball pot ser rellevant a l'hora de dissenyar nous experiments de marcatge per treballs futurs.

Apèndix

Apèndix 1. Model metabòlic utilitzat del metabolisme central de carboni de P.pastoris. (1.1) Reaccions del metabolisme central utilitzades per el càlcul de la distribució MFA ¹³C. El valor de CO₂ al igual que el O₂ i cofactors no foren utilitzats per el balanç de flux metabòlic. (1.2) Reaccions i transicions atòmiques utilitzades en l'anàlisi de flux mitjançant dades ¹³C, seguint la notació proposada per Wiechert [23].

1.1

Metabolisme del Metanol

43. MET => FORM
44. FORM => FOR + NADH
45. FOR + NAD⁺ => NADH + CO₂
46. Xu15P + FORM + ATP => ADP + GAP + DHA
47. GA3P_{per} => GA3P
48. DHA => GA3P

Assimilació de Glicerina

49. GOL + NAD⁺ + Pi + ATP => DHAP + NADH + ADP

Glicòlisis i Gluconeogènesis

50. Fru6P <=> Glc6P
51. 2 GA3P => Fru6P + Pi
52. GA3P + ADP + Pi + NAD⁺ => PG3 + ATP + NADH
53. PG3 <=> Pep
54. Pep + ADP => Pyr + ATP
55. Pyr + NAD⁺ => ACCoA_{mit} + CO₂ + NADH
56. Pyr + NAD⁺ => ACCoA_{cyt} + CO₂ + NADH
57. Pyr + CO₂ + ADP => Oaa_{cyt} + ATP

Via de les Pentoses Fosfat (PPP)

58. Glc6P + 2NADP⁺ => Ru15P + 2 NADPH + CO₂
59. Ru15P <=> R5P
60. Ru15P <=> Xu15P
61. R5P + Xu15P <=> Sed7P + GA3P
62. Sed7P + GA3P <=> Fru6P + E4P
63. Xu15P + E4P <=> Fru6P + GA3P
64. Xu15P + NADH => Ara + NAD⁺

Cicle dels àcids Tri-carboxílics (TCA)

65. ACCoA_{mit} + Oaa_{mit} => CIT
66. CIT => ICIT
67. ICIT + NAD⁺ => aKG + CO₂ + NADH
68. aKG + NAD⁺ => SUCCoA + CO₂ + NADH
69. SUCCoA + Pi + ADP => SUC + ATP
70. SUC + ATP => SUCCoA + ADP + Pi
71. SUC => FUM + FADH₂
72. FUM <=> MAL
73. MAL + NAD⁺ => Oaa_{mit} + NADH

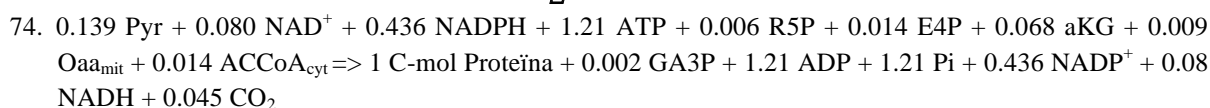
Biosíntesis dels diferents aminoàcids i interconverció de unitats d'un sol C (Reaccions exactament igual que les plantejades en el capítol anterior)

Reaccions de Transport i Reaccions de la cadena respiratòria (Reaccions exactament igual que les plantejades en el capítol anterior)

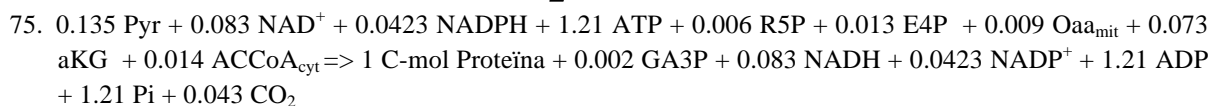
Síntesis de Biomassa

1. Síntesis de Proteïna

- *X-33 ROL sota condicions de creixement a $\mu = 0.05 h^{-1}$*



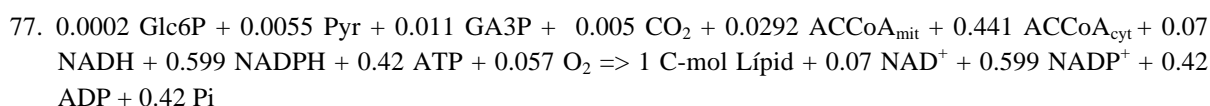
- *X-33 ROL sota condicions de creixement a $\mu = 0.16 h^{-1}$*



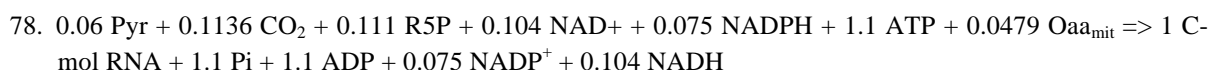
2. Síntesis de Carbohidrats



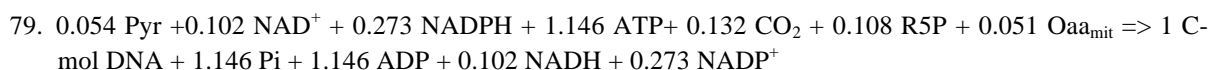
3. Síntesis de Lípids



4. Síntesis de RNA



5. Síntesis de DNA



1.2

Nom	Reacció
feedGlyA:	FullyGly > Gly_ext #abcdef > #abcdef
feedGlyB:	CGly > Gly_ext #abcdef > #abcdef
uptGly:	Gly_ext > Gly_int #abcdef > #abcdef
feedMeOHA:	MeOHL > MeOH_ext #a > #a
feedMeOHB:	MeOHN > MeOH_ext #a > #a
uptMeOH:	MeOH_ext > MeOH_int #a > #a
upt1:	Gly_int > DHAP #abcdef > #abcdef
upt2:	MeOH_int > Form #a > #a
emp1:	Fru6P <> Glc6P

	#abcdef > #abcdef
emp2:	FBP <> Fru6P #abcdef > #abcdef
emp3:	DHAP + GA3P <> FBP #abc + #def > #cbadef
emp4:	DHAP <> GA3P #abc > #abc
emp5:	GA3P <> PG3 #abc > #abc
emp5B:	PG3 <> PEP #abc > # abc
emp5C:	Pep > Pyr #abc > #abc
emp6:	Pyr > ACCO _{cyt} + CO ₂ #abc > #bc + #a
emp7:	Pyr + CO ₂ > OAA _{cit} #abc + #d > #abcd
emp9:	OAA _{cit} > OAA _{mit} #abcd > #abcd
emp8:	Pyr > Pyr _{mit} #abc > #abc
emp11:	ACCO _{cyt} > ACCO _{mit} #AB > #AB
ppp1:	Glc6P > CO ₂ + Rul5P #abcdef > #a + #bcdef
ppp2:	Rul5P <> Xul5P #abcde > #abcde
ppp3:	Rul5P <> Rib5P #abcde > #abcde
ppp4:	Xul5P + Ery4P <> GA3P + Fru6P #ABCDE + #abcd > #CDE + #ABabcd
ppp5:	Xul5P + Rib5P <> Sed7P + GA3P #abcde + #ABCDE > #ABabcde + #CDE
ppp6:	GA3P + Sed7P <> Ery4P + Fru6P #ABC + #abcdefg > #defg + #abcABC
TCA1:	Pyr _{mit} > ACCO _{mit} + CO ₂ #ABC > #BC + #A
TCA2:	ACCO _{mit} + OAA _{mit} > CIT #AB + #abcd > #dcbaBA
TCA3:	CIT > aKG + CO ₂ #ABCDEF > #ABCEF + #D
TCA4:	aKG > SUCC + CO ₂ #ABCDE > #BCDE + #A
TCA4B:	aKG > SUCC + CO ₂ #ABCDE > #EDCB + #A
TCA5:	SUCC <> FUM

	#ABCD > #ABCD
TCA5B:	SUCC <> FUM #ABCD > #DCBA
TCA6:	FUM <> MAL #ABCD > #ABCD
TCA7:	MAL <> OAA _{mit} #ABCD > #ABCD
Met1:	Form > CO ₂ #A > #A
Met2:	Xul5P + Form > DHA + GA3P _{per} #ABCDE + #F > #FAB + #CDE
Met2B:	Xul5P + Form > DHA + GA3P _{per} #ABCDE + #F > #ABF + #CDE
Met3:	DHA > DHAP #ABC > #ABC
Met4:	GA3P _{per} > GA3P #ABC > #ABC
BIO1:	Glc6P > Glc6P _{bio} #ABCDEF > #ABCDEF
BIO2:	Fru6P > Fru6P _{bio} #ABCDEF > #ABCDEF
BIO3:	ACCO _{cyt} > ACCO _{bio} #BC > #BC
BIO4:	OAA _{mit} > OAA _{bio} #ABCD > #ABCD
BIO5:	Ery4P > Ery4P _{bio} #ABCD > #ABCD
BIO6:	Rib5P > Rib5P _{bio} #ABCDE > #ABCDE
BIO7:	GA3P > GA3P _{bio} #ABC > #ABC
BIO8:	aKG > aKG _{bio} #ABCDE > #ABCDE
BIO9:	Py _{mit} > Py _{bio} #ABC > #ABC
CO2out:	CO ₂ > CO ₂ ext #A > #A

Distribució de fluxos en un sistema dinàmic d'enriquiment ¹³C

Apèndix 2. Visió general dels paràmetres de creixement macroscòpics de la soca X-33 de *P. pastoris* sota condicions de creixement amb diferents relacions de mescles de glicerina/metanol, experiments replica per tal de validar les dades prèviament descrites. Consum de substrat, biomassa i les taxes de producció de metabòlits per a cada condició de cultiu. Índex de consistència h per sota de 5 amb una redundància de 3 (nivell de confiança del 95%) per tots els casos.

h^{-1}	Glicerina/Metano l	Glicerina mmol/g _{DCW} .h	Metanol mmol/g _{DCW} .h	Arabitol mmol/g _{DCW} .h	OUR mmol/g _{DCW} .h	CER mmol/g _{DCW} .h	Biomassa mmol/g _{DCW} .h	RQ	Activitat Específica (UA/g _{DCW})	*Y _{s/x} (g _{DCW} /g)
$\square=0.05$	80%_20%	-0.94 ± 0.06	-0.82 ± 0.1	0	-2.62 ± 0.2	1.78 ± 0.1	1.85 ± 0.2	0.68 ± 0.2	2316 ± 88	0.49 ± 0.08
	60%_40%	-0.58 ± 0.06	-1.50 ± 0.1	0	-2.66 ± 0.2	1.61 ± 0.1	1.64 ± 0.1	0.61 ± 0.2	1467 ± 4	0.45 ± 0.07
	40%_60%	-0.48 ± 0.03	-2.60 ± 0.1	0	-3.59 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.96 ± 0.2	0.58 ± 0.2	2105 ± 14	0.40 ± 0.07
$\square=0.16$	80%_20%	-2.33 ± 0.15	-0.42 ± 0.1	0.04 ± 0.01	-3.68 ± 0.3	2.15 ± 0.2	5.07 ± 0.5	0.56 ± 0.3	78 ± 3	0.69 ± 0.13
	60%_40%	-2.63 ± 0.13	-1.19 ± 0.1	0.24 ± 0.03	-4.58 ± 0.4	2.64 ± 0.32	5.25 ± 0.4	0.55 ± 0.4	8 ± 2	0.55 ± 0.12
	40%_60%	-2.34 ± 0.14	-2.52 ± 0.1	0.23 ± 0.03	-5.19 ± 0.3	2.82 ± 0.3	5.57 ± 0.5	0.54 ± 0.4	142 ± 4	0.56 ± 0.13

Apèndix 3. Distribució d'isotòmers simulada dels aminoàcids utilitzats per a la distribució d'anàlisi de flux metabòlic. Les taules representen la comparació entre els valors- f mesurats i els simulats per cadascuna de les diferents relacions de carboni avaluades.

40% Glicerina 60% Metanol $\square=0.16h^{-1}$																
	His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β	
	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat
$f(1)$	0.11	0.10	0.08	0.10	0.54	0.54	0.11	0.10	0.21	0.23	0.57	0.51	0.14	0.15	0.17	0.15
$f(2)$	0.00	0.01	0.01	0.78	0.46	0.46	0.00	0.01	0.27	0.22	0.11	0.07	0.02	0.02	0.16	0.14

Capítol 4

40% Glicerina 60% Metanol $\square = 0.05h^{-1}$																
His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β		
Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	
<i>f</i> (1)	0.54	0.50	0.55	0.50	0.87	0.87	0.49	0.50	0.66	0.57	0.82	0.71	0.66	0.56	0.67	0.56
<i>f</i> (2)	0.00	0.07	0.45	0.38	0.13	0.13	0.01	0.07	0.06	0.12	0.09	0.09	0.04	0.10	0.13	0.19
<i>f</i> (2*)	0.00	0.07	0.00	0.07			0.01	0.07	0.22	0.22	0.08	0.17	0.17	0.19	0.17	0.18
<i>f</i> (3)	0.46	0.36	0.00	0.05			0.49	0.35	0.06	0.08	0.01	0.02	0.13	0.15	0.03	0.07

60% Glicerina 40% Metanol $\square = 0.16h^{-1}$																
His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β		
Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	
<i>f</i> (1)	0.04	0.06	0.04	0.06	0.59	0.58	0.02	0.06	0.20	0.20	0.55	0.50	0.07	0.11	0.09	0.10
<i>f</i> (2)	0.00	0.01	0.96	0.81	0.41	0.42	0.00	0.01	0.30	0.31	0.00	0.08	0.03	0.02	0.14	0.12
<i>f</i> (2*)	0.00	0.01	0.00	0.01			0.00	0.01	0.39	0.38	0.45	0.36	0.15	0.13	0.73	0.65
<i>f</i> (3)	0.96	0.92	0.00	0.13			0.97	0.92	0.12	0.11	0.00	0.06	0.75	0.74	0.04	0.12

60% Glicerina 40% Metanol $\square = 0.05h^{-1}$																
His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β		
Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	
<i>f</i> (1)	0.35	0.31	0.37	0.33	0.78	0.80	0.31	0.31	0.47	0.47	0.60	0.68	0.51	0.45	0.47	0.46
<i>f</i> (2)	0.01	0.06	0.61	0.55	0.22	0.20	0.03	0.06	0.15	0.14	0.13	0.10	0.07	0.09	0.28	0.28
<i>f</i> (2*)	0.02	0.06	0.00	0.05			0.04	0.06	0.28	0.31	0.19	0.19	0.25	0.29	0.18	0.18
<i>f</i> (3)	0.61	0.57	0.02	0.08			0.63	0.57	0.10	0.08	0.08	0.03	0.16	0.17	0.07	0.08

Distribució de fluxos en un sistema dinàmic d'enriquiment ^{13}C

80% Glicerina 20% Metanol $\lambda = 0.16\text{h}^{-1}$																
His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β		
Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	
$f(1)$	0.15	0.11	0.13	0.11	0.64	0.64	0.10	0.11	0.26	0.24	0.58	0.52	0.14	0.12	0.15	0.12
$f(2)$	0.00	0.01	0.88	0.76	0.36	0.36	0.00	0.01	0.31	0.30	0.00	0.07	0.03	0.02	0.06	0.05
$f(2^*)$	0.00	0.01	0.00	0.01			0.00	0.01	0.33	0.36	0.42	0.35	0.07	0.05	0.79	0.71
$f(3)$	0.86	0.84	0.00	0.12			0.90	0.85	0.11	0.10	0.00	0.06	0.76	0.81	0.00	0.12

80% Glicerina 20% Metanol $\lambda = 0.05\text{h}^{-1}$																
His C- α		His C- β		His C- $\delta 2$		Phe C- α		Glu C- α		Glu C- β		Asp C- α		Asp C- β		
Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	Mesurat	Calculat	
$f(1)$	0.26	0.21	0.24	0.23	0.70	0.74	0.27	0.21	0.31	0.43	0.79	0.69	0.42	0.39	0.45	0.39
$f(2)$	0.01	0.05	0.76	0.65	0.30	0.28	0.00	0.05	0.02	0.10	0.05	0.10	0.03	0.09	0.29	0.31
$f(2^*)$	0.02	0.05	0.00	0.03			0.00	0.05	0.30	0.37	0.12	0.18	0.32	0.31	0.21	0.21
$f(3)$	0.74	0.69	0.00	0.09			0.73	0.69	0.37	0.10	0.05	0.02	0.22	0.21	0.05	0.09

Apèndix 4. Resultats de la estimació de fluxos procedents del càlcul amb ¹³CFlux2. Fluxos intracel·lulars sota les condicions avaluades en aquest estudi escalades a la mateixa producció de biomassa.

Glicerina Metanol $\square=0.05h^{-1}$								
80%_20% mmol/g _{DCW} .h			60%_40% mmol/g _{DCW} .h			40%_60% mmol/g _{DCW} .h		
Reacció	Flux Net	sd	Reacció	Flux Net	sd	Reacció	Flux Net	sd
CO2out	0.97	0.05	CO2out	1.16	0.02	CO2out	1.25	0.03
Met1	0.17	0.09	Met1	0.55	0.15	Met1	0.79	0.32
Met2	0.09	0.09	Met2	0.14	0.08	Met2	0.25	0.16
Met3	0.09	0.09	Met3	0.14	0.08	Met3	0.25	0.16
Met4	0.17	0.07	Met4	0.27	0.15	Met4	0.50	0.32
Met5	0.17	0.07	Met5	0.27	0.15	Met5	0.50	0.32
emp1	0.04	0.18	emp1	0.04	0.20	emp1	0.03	0.32
emp2	0.18	0.10	emp2	0.25	0.17	emp2	0.39	0.32
emp3	0.18	0.10	emp3	0.25	0.17	emp3	0.39	0.32
emp4	0.52	0.04	emp4	0.46	0.03	emp4	0.41	0.03
emp5	0.44	0.04	emp5	0.38	0.03	emp5	0.34	0.03
emp5B	0.44	0.04	emp5B	0.38	0.03	emp5B	0.34	0.03
emp5C	0.44	0.04	emp5C	0.38	0.03	emp5C	0.34	0.03
emp6	0.24	0.03	emp6	0.20	0.03	emp6	0.13	0.03
emp7	0.04	0.01	emp7	0.04	0.01	emp7	0.04	0.01
emp8	0.16	0.03	emp8	0.15	0.01	emp8	0.16	0.01
emp9	0.03	0.00	emp9	0.03	0.01	emp9	0.03	0.01
emp11	0.16	0.03	emp11	0.12	0.06	emp11	0.07	0.03
ppp1	0.00	0.18	ppp1	0.00	0.00	ppp1	0.00	0.32
ppp2	0.05	0.14	ppp2	0.08	0.18	ppp2	0.16	0.32
ppp3	-0.05	0.05	ppp3	-0.08	0.03	ppp3	-0.16	0.03
ppp4	-0.07	0.05	ppp4	-0.09	0.03	ppp4	-0.17	0.03
ppp5	-0.06	0.05	ppp5	-0.09	0.03	ppp5	-0.16	0.03
ppp6	-0.06	0.05	ppp6	0.00	0.00	ppp6	0.00	0.00
ppp7	0.00	0.00	ppp7	0.00	0.00	ppp7	0.00	0.00
tca1	0.10	0.02	tca1	0.08	0.03	tca1	0.09	0.03
tca2	0.26	0.05	tca2	0.20	0.03	tca2	0.15	0.03
tca3	0.26	0.05	tca3	0.20	0.03	tca3	0.15	0.03
tca4	0.12	0.02	tca4	0.08	0.01	tca4	0.06	0.01
tca4B	0.12	0.02	tca4B	0.08	0.01	tca4B	0.06	0.01
tca5	0.12	0.02	tca5	0.08	0.01	tca5	0.06	0.01
tca5B	0.12	0.02	tca5B	0.08	0.01	tca5B	0.06	0.01
tca6	0.23	0.04	tca6	0.17	0.03	tca6	0.12	0.03
upt1	0.53	0.02	upt1	0.43	0.01	upt1	0.30	0.02
upt2	0.34	0.03	upt2	0.82	0.02	upt2	1.29	0.04
uptMetN	0.30	0.03	uptMetN	0.73	0.01	uptMetN	1.15	0.03
uptMetU	0.04	0.01	uptMetU	0.10	0.00	uptMetU	0.16	0.00
uptUGly	0.06	0.00	uptUGly	0.05	0.00	uptUGly	0.04	0.00
uptNGly	0.47	0.01	uptNGly	0.38	0.01	uptNGly	0.26	0.01
biomassa	1.00	0.06	biomassa	1.00	0.07	biomassa	1.00	0.06

Glicerina Metanol m=0.16h ⁻¹								
80%_20% mmol/g _{DCW} .h			60%_40% mmol/g _{DCW} .h			40%_60% mmol/g _{DCW} .h		
Reacció	Flux Net	sd	Reacció	Flux Net	sd	Reacció	Flux Net	sd
CO2out	0.762	0.007	CO2out	0.581	0.034	CO2out	0.638	0.048
Met1	0.000	0.000	Met1	0.300	0.034	Met1	0.366	0.081
Met2	0.020	0.018	Met2	0.000	0.000	Met2	0.009	0.006
Met3	0.020	0.018	Met3	0.000	0.000	Met3	0.009	0.006
Met4	0.042	0.035	Met4	0.000	0.000	Met4	0.017	0.013
Met5	0.042	0.035	Met5	0.000	0.000	Met5	0.017	0.013
emp1	0.577	0.040	emp1	0.052	0.034	emp1	0.041	0.088
emp2	0.284	0.037	emp2	0.094	0.020	emp2	0.079	0.022
emp3	0.284	0.037	emp3	0.094	0.020	emp3	0.081	0.022
emp4	0.315	0.005	emp4	0.373	0.007	emp4	0.344	0.018
emp5	0.227	0.004	emp5	0.254	0.005	emp5	0.267	0.006
emp5B	0.227	0.004	emp5B	0.254	0.005	emp5B	0.267	0.006
emp5C	0.227	0.004	emp5C	0.254	0.005	emp5C	0.267	0.006
emp6	0.081	0.022	emp6	0.098	0.018	emp6	0.116	0.028
emp7	0.042	0.011	emp7	0.045	0.002	emp7	0.042	0.002
emp8	0.105	0.004	emp8	0.114	0.004	emp8	0.108	0.015
emp9	0.035	0.000	emp9	0.037	0.000	emp9	0.035	0.000
emp11	0.059	0.022	emp11	0.069	0.018	emp11	0.057	0.002
ppp1	0.531	0.040	ppp1	0.008	0.036	ppp1	0.000	0.000
ppp2	0.359	0.037	ppp2	0.007	0.027	ppp2	-0.002	0.053
ppp3	0.171	0.004	ppp3	0.000	0.011	ppp3	0.002	0.035
ppp4	0.155	0.004	ppp4	-0.018	0.011	ppp4	-0.013	0.036
ppp5	0.161	0.004	ppp5	-0.009	0.011	ppp5	-0.007	0.036
ppp6	0.161	0.004	ppp6	-0.009	0.011	ppp6	-0.007	0.036
ppp7	0.001	0.000	ppp7	0.032	0.005	ppp7	0.002	0.018
tca1	0.035	0.014	tca1	0.040	0.018	tca1	0.039	0.015
tca2	0.095	0.004	tca2	0.108	0.005	tca2	0.097	0.004
tca3	0.095	0.004	tca3	0.108	0.005	tca3	0.097	0.004
tca4	0.031	0.002	tca4	0.036	0.002	tca4	0.031	0.002
tca4B	0.031	0.002	tca4B	0.036	0.002	tca4B	0.031	0.002
tca5	0.031	0.002	tca5	0.036	0.002	tca5	0.031	0.002
tca5B	0.031	0.002	tca5B	0.036	0.002	tca5B	0.031	0.002
tca6	0.062	0.004	tca6	0.072	0.005	tca6	0.061	0.004
upt1	0.557	0.013	upt1	0.464	0.016	upt1	0.408	0.046
upt2	0.043	0.007	upt2	0.300	0.030	upt2	0.382	0.079
uptMetN	0.038	0.004	uptMetN	0.263	0.027	uptMetN	0.336	0.070
uptMetU	0.005	0.001	uptMetU	0.038	0.004	uptMetU	0.046	0.010
uptUGly	0.075	0.002	uptUGly	0.062	0.002	uptUGly	0.049	0.006
uptNGly	0.480	0.011	uptNGly	0.382	0.014	uptNGly	0.358	0.040
biomassa	1.000	0.077	biomassa	1.000	0.062	biomassa	1.000	0.083

Bibliografia

1. Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Szyperski T, Ferrer P: **Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol / methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates.** *Microbiology* 2007;433–448.
2. Szyperski T: **Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1995, **232**:433–448.
3. Wiechert W, Möllney M, Isermann N, Wurzel M, Graaf AA De: **Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems.** *Biotechnology and Bioengineering* 1999, **66**:69–85.
4. Weitzel M, Nöh K, Dalman T, Niedenführ S, Stute B, Wiechert W: **¹³CFLUX2 High Performance Software Suite for ¹³C-Metabolic Flux Analysis.** *Bioinformatics* 2012:1–3.
5. Wiechert W, Wurzel M: **Metabolic isotopomer labeling systems Part I : global dynamic behavior.** *Mathematical Biosciences* 2001, **169**:173–205.
6. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2001, **86**:59–70.
7. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P: **A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**:141.
8. Solà A, Maaheimo H, Ylönen K, Ferrer P, Szyperski T: **Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2004, **271**:2462–2470.
9. Sohn SB, Graf AB, Kim TY, Gasser B, Maurer M, Ferrer P, Mattanovich D, Lee SY: **Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production.** *Biotechnology Journal* 2010, **5**:701–715.
10. Chung BKS, Selvarasu S, Camattari A, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee H, Lee D: **Genome-scale metabolic reconstruction an in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement.** *Microbial Cell Factories* 2010:50–65.
11. Caspeta L, Shoaie S, Agren R, Nookaew I, Nielsen J: **Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in-silico evaluation of their potentials.** *BMC Systems Biology* 2012, **6**:24.
12. Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J: **Review of cellular metabolism.** In *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. 1998, **16**:22–76.
13. Verduyn C: **Physiology of yeast in relation to biomass yields.pdf.** *Biomedical and Life Science* 1991, **60**:325–353.

14. Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P, Albiol J: **Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:65.
15. Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, Sauer M, Altmann F, Ferrer P, Mattanovich D, Cerdanyola B: **The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris* research articles.** *Journal of Proteome Research* 2009:1380–1392.
16. Tortajada M, Llaneras F, Picó J: **Validation of a constraint-based model of *Pichia pastoris* metabolism under data scarcity.** *BMC Systems biology* 2010, **4**:115.
17. Verheijen PJT: **Data Reconciliation and Error Detection.** In *The Metabolic Pathway Engineering Handbook*. edited by Smoke C CRC Press; 2010, **8**:8.1–8.13.
18. Paulová L, Hyka P, Branská B, Melzoch K, Kovar K: **Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut+.** *Journal of Biotechnology* 2012, **157**:180–188.
19. Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U: **Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:545–558.
20. Bakker BM, Overkamp KM, AJ van M, Kötter P, Luttik MA, JP van D, Pronk JT: **Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2001, **25**:15–37.
21. Valadi A, Granath K, Gustafsson L, Adler L: **Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺ dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:39677–39685.
22. Celton M, Goelzer A, Camarasa C, Fromion V, Dequin S: **A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metabolic Engineering* 2012, **14**:366–379.

Introducció

L'anàlisi de fluxos metabòlics mitjançant diferents tècniques de ^{13}C é una eina cada vegada més valorada en el camp de la biologia de sistemes aplicada a l'estudi del metabolisme microbià. Usualment, l'anàlisi de fluxos mitjançant tècniques de marcatge isotòpic amb ^{13}C es basa en la detecció dels patrons de marcatge dels aminoàcids proteics utilitzant tècniques com NMR (o MS), tal i com s'ha descrit en els capítols previs d'aquest treball. Per aconseguir aquesta informació son necessaris temps de marcatge relativament llargs, ja que és indispensable aconseguir un estat estacionari isotòpic per tal d'obtenir consistència en les mesures realitzades. És en aquest estat quant l'enriquiment de les cadenes carbonades dels metabòlits precursors primaris és igualment present en els aminoàcids proteics [1] [2] [3] [4].

La mesura directa de l'enriquiment isotòpic de metabòlits primaris intracel·lulars ens permet una reducció del temps considerable dels experiments de marcatge a més de la obtenció d'informació addicional del comportament biològic amb el temps del nostre sistema. En conseqüència, obtenim una determinació més acurada dels fluxos, incloent fluxos més enllà del metabolisme central de carboni [5] [6]. No obstant, calen tècniques precises de presa de mostra i extracció de metabòlits cel·lulars per a realitzar una quantificació acurada dels metabòlits intracel·lulars. Afortunadament, recentment s'ha desenvolupat una metodologia de presa de mostra ràpida i d'extracció de metabòlits adequada per a cèl·lules de *P. pastoris* creixent amb glucosa [7], oferint així la possibilitat d'estudiar el metaboloma d'aquest llevat i l'aplicació de tècniques d'anàlisi de fluxos metabòlics basades en la mesura directa d'enriquiment isotòpic de metabòlits intracel·lulars. En aquest capítol, s'han validat els protocols per a l'anàlisi metabolòmica per a cèl·lules creixent en presència de metanol.

La utilització de més d'una font de carboni es interessant en el context metodològic de càlcul de fluxos mitjançant ^{13}C , ja que encara no s'ha descrit cap estudi comparatiu de metodologies d'anàlisi de fluxos metabòlics basades en ^{13}C per a aquest tipus d'estratègies de cultiu per a cap microorganisme . A més a més, tenint en compte que l'estimació de fluxos metabòlics pot ser dependent de la tècnica aplicada, la combinació de les diferents tècniques de quantificació ^{13}C així com la utilització d'una eina matemàtica adequada, podria generar una descripció fenotípica metabòlica més acurada [8] .

En els capítols anteriors s'ha estès el formalisme clàssic d'anàlisi de fluxos metabòlics en *P. pastoris* sota condicions de creixement amb mesclades de glucosa-metanol utilitzant patrons de marcatge ^{13}C d'aminoàcids proteics com a restricció del sistema plantejat (Capítol 3). Ara bé, aquesta tècnica no ens va permetre una caracterització quantitativa acurada del metabolisme del metanol i les vies relacionades, ja que no hi ha cap ruta de síntesi d' aminoàcid proteic directament relacionat amb intermediaris metabòlics d'aquesta via (Capítol 1).

Així doncs, en aquest estudi s'ha utilitzat per primera vegada la informació provinent del marcatge ^{13}C procedent dels metabòlits primaris per a estimar la distribució de fluxos en cèl·lules de llevat creixent en una barreja glucosa-metanol com a font de carboni. Comparat amb els estudis realitzats en els capítols anteriors, la xarxa metabòlica inicialment formulada s'ha estès, permetent així l'adquisició de nous coneixements sobre la topologia del sistema biològic en estudi, incloent informació sobre el grau de reversibilitat de diferents reaccions metabòliques de la xarxa.

Finalment, la comparació entre la distribució de fluxos metabòlics obtinguda mitjançant la metodologia de ¹³C-MFA basada en dades procedents de quantificació directa de metabòlits primaris amb espectrometria de masses (MS), ens permeteren validar l'estudi realitzat en el Capítol 3 mitjançant NMR.

Amb els resultats de MFA obtinguts, s'ha estudiat el balanç de cofactors del sistema per tal de formular noves hipòtesis sobre el comportament metabòlic de *P. pastoris* en condicions de co-assimilació de glucosa i metanol.

Materials i mètodes

Soques i condicions de cultiu

En aquest estudi s'ha utilitzat una soca recombinant derivada de *P. pastoris* X-33 (Invitrogen), la qual té el plàsmid pGAP α A (Invitrogen) integrat al seu genoma [9].

Es realitzaren experiments en continu per duplicat en bioreactors de 2L de volum (Applikon, The Netherlands), amb un volum de treball final d'1L, i utilitzant una unitat de control Sartorius Biostat B⁺. El medi de cultiu utilitzat fou el mateix anteriorment descrit [10]. Concretament, les quantitats de carboni i font de nitrogen en el medi continu foren reduïdes per tal d'obtenir una concentració de biomassa en estat estacionari al voltant de 4g/l. La relació entre els dos substrats glucosa:metanol fou de 4:1, és a dir, es mantingué la mateixa relació descrita en el Capítol 3. Tots els altres components del medi es reajustaren per tal d'obtenir una concentració residual comparable amb els cultius previs. De la mateixa manera, el medi per l'etapa inicial en *batch* fou reajustat per tal d'obtenir uns valors de biomassa finals adequats. Així, el medi per a l'etapa inicial fou: 8 g/l glicerol, 0.9 g/l àcid cítric mono hidratat, 12.6 g/l (NH₄)₂HPO₄, 0.5 g/l MgSO₄·7H₂O, 1.5 g/l KH₂PO₄, 0.02 g/l CaCl₂·2H₂O, 5 ml/l de la solució de sals traça i 2 ml/l d'una solució de Biotina (0.2g/l). La composició del medi en continu fou: 7.04 g/l glucosa mono hidratada, 1.6 g/l metanol, 0.915 g/l àcid cítric, 2 g/l (NH₄)₂HPO₄, 0.3 g/l MgSO₄·7H₂O, 1.4 g/l KH₂PO₄, 0.01 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.5 ml/l de la solució sals traça i 0.3 ml/l de Biotina (0.2g/l). La composició de les sals traça fou la mateixa descrita en la bibliografia [10].

Els cultius pre-inòcul es realitzaren en matràs agitat de 1 l de volum, amb 200 ml de medi YPD (10g/l extracte de llevat, 20 g/l peptona i 10 g/l glucosa). El cultiu s'incubà entre 20-24 hores a 30 °C a 250 rpm. Posteriorment es centrifugà i les cèl·lules es resuspenen en 100 ml d'aigua estèril per inocular el reactor. Un cop finalitzada l'etapa de '*batch*', indicada pel perfil de CO₂ del cultiu (aproximadament 24 hores després d'inocular el reactor), s'inicià la fase en continu, mantenint les condicions carboni-limitants amb una velocitat d'alimentació de 0.09h⁻¹. L'aeració es controlà mitjançant cabalímetres màssics (5850 Smart Mass Flow Controller, Brooks Instrument) amb un valor fixat d'1 l per minut. El valor de pO₂ es mantingué per sobre del 40 %, assegurant així condicions completament aeròbiques. Les concentracions d'O₂ i CO₂ en la sortida de gasos es mesuraren mesurades en temps real utilitzant analitzadors d'infraroig (NGA 2000, Rosemount, USA). Tots els altres paràmetres de cultiu es fixa de la mateixa manera que en els experiment anteriors (Capítol 3).

Experiment de marcatge

Després d'un mínim de cinc temps de residència amb el cultiu en condicions estables, es canvià l'aliment inicial ^{12}C per un medi amb la font de carboni totalment marcada amb ^{13}C . La composició isotòpica de la font de carboni del medi ^{13}C s'escollí d'acord amb el plantejament proposat per Nöh & Wiechert [11]. Així, la glucosa introduïda fou una barreja de 80% [$1\text{-}^{13}\text{C}_1$] i 20% [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]. Pel que fa al metanol, s'escollí es marcà totalment 100% [$\text{U-}^{13}\text{C}_1$]. Immediatament després del canvi de medi, s'extragueren més de 10 mostres del brou de cultiu durant els primers 5 min, continuant amb aquest procés durant les 6 hores següents, durant les quals s'extragueren 10 mostres més distribuïdes en el temps.

Presa de mostra i mesura de les concentracions dels metabòlits

Les mostres necessàries per la mesura de concentracions dels metabòlits i aminoàcids es realitzaren aproximadament 1 hora abans de l'inici de l'experiment de marcatge amb ^{13}C , utilitzant la metodologia de mostreig ràpid [12]. S'utilitzà el protocol d'extracció i processament de les mostres recentment descrit per a *P. pastoris* creixent amb glucosa [7].

Per tal d'obtenir una quantificació dels metabòlits i aminoàcids intracel·lulars acurada, s'aplicà la metodologia ID-MS (Dilució Isotòpica per espectrometria de Masses) [13] [14], on 120 μl d'un extracte cel·lular ^{13}C utilitzat com a patró intern (4°C) s'afegí directament sobre el filtre amb les cèl·lules de la mostra retingudes. Aquest extracte cel·lular, conté tots els metabòlits i aminoàcids uniformement marcats amb ^{13}C ($\text{U-}^{13}\text{C}$) i s'obtingué a partir d'un cultiu en discontinu alimentat (*fed-batch*) de *S. cerevisiae*, on s'utilitzà des del moment inicial font de carboni totalment marcada amb ^{13}C , concretament una barreja de glucosa $\text{U-}^{13}\text{C}$ i etanol $\text{U-}^{13}\text{C}$, tal i com es descriu a [13]. Per a cadascun dels experiments de marcatge realitzats, s'extragueren un total de 20 mostres del bioreactor. Els temps de presa de mostra es seleccionaren d'acord amb el disseny exponencial proposat per Nöh [11]. L'extracció de metabòlits es dugué a terme d'acord amb el protocol descrit per Carnicer [7], una vegada feta la comprovació prèvia. Tots els passos successius a la presa de mostra es realitzaren de la forma prèviament descrita a [15]. Les mostres obtingudes durant l'experiment de marcatge s'analitzaren mitjançant LC/MS i GC/MS [16]. Finalment, es corregí la distribució dels isotopomers massics obtinguda per tal de tenir en compte el pas de derivatització prèvia la injecció en el detector, així com l'impacte dels carbonis no marcats, utilitzat una eina de correcció de MS [17].

Anàlisi de fluxos metabòlic basat en dades de marcatge amb ^{13}C en condicions no estacionàries (INST- ^{13}C -MFA)

La xarxa metabòlica utilitzada en aquest capítol per a l'anàlisi de fluxos metabòlics és una modificació de la prèviament descrita en el capítol 3 d'aquest treball. Tal i com és discuteix en la secció de resultats, el model metabòlic inicial s'ha estès, incorporant el metabolisme de la trehalosa, reaccions de la piruvat deshidrogenasa i reaccions reversibles per la síntesis d'alguns aminoàcids (Ala, Asp i Glu). Així doncs, el model metabòlic utilitzat en aquest capítol conté un total de 37

metabòlits i 79 reaccions metabòliques (incloent els fluxos bidireccionals),(veure Apèndix 1), de les quals es limitaren 17 fluxos independents en base a les següents premisses:

- I) la mesura dels substrats i productes consumits /produïts (3 fluxos)
- II) les reaccions de síntesis de biomassa, formulades a partir de la composició de biomassa en *P. pastoris* creixent en la barreja de glucosa/metanol utilitzada en aquest estudi, descrita al Capítol 2. (9 fluxos).
- III) reaccions en la xarxa metabòlica capaces de formar dos compostos simètrics (Met2, Tca4, Tca5 fwd&bwd), les quals es forçaren a tenir la mateixa distribució de flux amb una divisió de 1:1 per a cadascuna de les formes produïdes.(4 fluxos).
- IV) una restricció de flux (emp11C=emp11D) per la font de piruvat ¹²C. Aquests dos fluxos (entrada i sortida de ¹²C-piruvat) foren restringits a tenir el mateix valor per tal de mantenir el balanç de carboni global inalterable (1 flux).

Per tal de realitzar la simulació de les diferents distribucions d'isotopomers màssics, s'utilitzà el concepte de cumomer on no s'observa la posició del carboni marcat sinó quants carbonis ¹³C hi ha en la molècula observada [6]. La distribució de fluxos de carboni en la xarxa establerta és determinada com el millor ajust possible donat entre els fluxos calculats i la distribució d'isotopomers màssics simulada, tenint en compte els fluxos extracel·lulars mesurats i les distribucions màssiques mesurades per els diferents metabòlits de la xarxa ponderats per la variància experimental obtinguda. El valor experimental de la variància s'estimà d'acord amb experiments previs com a variància constant amb un valor del 2% per a totes les distribucions mesurades. La solució numèrica i l'estimació de paràmetres basada en maximitzar l'equació de 'likelihood' del model dinàmic isotopomèric s'obtingueren utilitzant el programa de càlcul gPROMS 3.1 (PSE Limited, London). Concretament, per a l'estimació de paràmetres s'utilitzà el model SRQP (algoritme iteratiu) per resoldre problemes no lineals, el qual incorpora un mètode pre-programat seqüencial quadràtic. Per al càlcul de la desviació estàndard dels fluxos calculats s'utilitzà la matriu de variància- covariància dels paràmetres del model, calculada d'acord amb la informació de la matriu de Fisher implementada en gPROMS. El vector dels paràmetres es construï amb els fluxos lliures (graus de llibertat: 79 fluxos – 37 equacions de balanç -17 restriccions = 25 paràmetres) i les concentracions no mesurades (10 paràmetres). Cal comentar que es considerà un valor acceptable per a tots els resultats presentats en aquest treball quan el mínim valor de residual ponderat assolit fos menor que el χ^2 a un nivell de confiança del 95% per als corresponents graus de llibertat. Per reaccions altament reversibles, s'introduïren fluxos bidireccionals, és a dir reaccions endavant (fwd) i reaccions endarrere (bwd) separades. Les mesures màssiques d'isotopomers utilitzades per l'estimació de paràmetres es representen en la Figura 8 i llistades en l'Apèndix 4.

En total, s'utilitzaren 80 fraccions d'isotopomers màssics en 20 punts diferents (1600 punts d'informació) per la simulació i es consideraren 27 concentracions intracel·lulars determinades abans de l'inici de l'experiment amb ¹³C.

Anàlisi termodinàmic de la xarxa metabòlica utilitzada.

La consistència de les concentracions intracel·lulars dels metabòlits mesurades es verificà d'acord amb la segona llei de la termodinàmica: Una reacció solament pot ocórrer en la direcció d'un canvi negatiu d'energia negativa de l'energia lliure de Gibbs [18]. Aquest enfocament, basat en la xarxa metabòlica establerta, també ens permet estimar el rang de la concentració d'algun metabòlic que no ha estat possible de mesurar experimentalment. Els càlculs per verificar la consistència de les dades de metabòlica i la xarxa metabòlica s'efectuaren utilitzant un programa de càlcul (anNET) desenvolupat per Zamboni [19]. Donat que en la realització de tots els càlculs termodinàmics s'utilitzaren concentracions molars, ha calgut fer la conversió dels resultats experimentals (expressats en mmol/g_{DCW}) considerant diferents valors de volums cel·lulars, ja que no disposem de mesures experimentals del volum real de *P. pastoris* en les condicions de cultiu fixades. Basant-nos en estudis previs amb *S. cerevisiae*, s'escollí un interval entre 1.4 i 2 ml/g_{DCW} [20]. Tot i aquesta aproximació, els valors de les restriccions termodinàmiques obtinguts foren equivalents independentment del volum cel·lular escollit. Per tant, es fixà arbitràriament un volum cel·lular mig de 1.7 ml/g_{DCW} per a dur a terme l'anàlisi amb el programa anMET. D'altra banda, degut a la manca d'informació sobre el volum dels diferents compartiments cel·lulars, solament es tingué en compte el citosol com a únic espai intracel·lular i tots els metabòlits provinents de la via glicolítica i pentoses fosfat foren inclosos en aquest compartiment, incloent les reaccions d'assimilació de metanol. Els metabòlits provinents del TCA no foren inclosos en aquest anàlisi.

Tots els rangs de concentració factibles dels diferents metabòlits intracel·lulars mesurats es varen calcular d'acord amb el seu valor experimental mitjà i amb la seva desviació estàndard, definint el possible valor inferior i el superior d'acord amb una distribució de t- Student amb un interval de confiança del 80% . Per a tots aquells metabòlits no mesurats, es va establir un possible rang de concentració (Figura 5). Aquets rangs de concentració foren minimitzats amb l'ajut de l'anàlisi 'NET' per tal de complir les restriccions termodinàmiques [20] [21].

Tal i com es feu amb el volum cel·lular, s'assumí una força iònica intracel·lular de 0.15 M, d'acord amb dades experimentals de *S. cerevisiae* obtingudes per aquets paràmetre [22], mentre que el pH intracel·lular es fixà a 7.2 d'acord amb mesures experimentals del citosol de *P. pastoris* (comunicació personal D. Mattanovich, BOKU, Viena). Aquest valor de pH és lleugerament més elevat que el descrit en la bibliografia per *S. Cerevisiae* [23]. De la mateixa forma que amb el cas del volum cel·lular, es consideraren diferents valors de pH (7.0 , 7.2 i 7.5) per a realitzar els càlculs..

Procediments analítics

Anàlisi de biomassa

La concentració cel·lular es va seguir mitjançant la densitat òptica dels cultius a 600 nm (OD₆₀₀). La mesura del pes sec (*Cell Dry Weight*, CDW) es realitzar prenent 5 ml de brou de cultiu, el qual es filtrà utilitzant filtres de fibra de vidre (Millipore 0.45 µm) prèviament pesats i assecats. La pasta cel·lular retinguda al filtre es rentà dos cops utilitzant el mateix volum d'aigua destil·lada i

posteriorment assecada durant 24h. en una estufa a 100 °C. Cada una de les mostres extretes s'analitzà per triplicat, tant per OD₆₀₀ com per pes sec .

La composició macromolecular i elemental de la biomassa utilitzada en aquest estudi fou la descrita en el Capítol 3 d'aquest treball, és a dir, corresponent a cèl·lules cultivades en condicions de creixement anàlogues a les descrites en aquest estudi. La recuperació de carboni en el balanç macroscòpic abans del pas de reconciliació fou superior al 98% en tots els experiments realitzats. Així mateix, es verificaren les dades experimentals mitjançant procediments de reconciliació i utilitzant la consistència estàndard de les dades sota les restriccions de conservació de les relacions elementals, seguint la mateixa metodologia utilitzada en capítols anteriors [22][23][24]. Així doncs, el test de consistència estadística de les dades experimentals dels cultius en continu realitzats es realitzà amb un nivell de confiança del 95%, indicant que no havia cap indicatiu d'errors considerables en cap de les mesures.

Quantificació de metabòlits extracel·lulars

Les mostres del brou de cultiu (per triplicat, 5 ml cada rèplica) per a l'anàlisi de metabòlits extracel·lulars es centrifugaren a 6000 rpm durant 3 min amb una micro-centrífuga (Minispin, Eppendorf) per tal d'eliminar les cèl·lules del medi i seguidament es filtraren mitjançant filtres de 0.45 µm (Millipore tipus HAWP). La glucosa, metanol i altres possibles compostos extracel·lulars s'analitzaren mitjançant HPLC utilitzant un columna d'intercanvi iònic (ICSep ICE-COREGEL 87H3, Transgènic) i 6 mM d'àcid sulfúric com a fase mòbil .

Resultats

Anàlisi dels cultius

La soca de referència X-33 es cultivà aeròbiamment en condicions carboni-limitants amb la barreja de 80/20 de glucosa/metanol, a una velocitat de dilució de 0.09 h⁻¹, resultant amb unes condicions comparables a les dels experiments realitzats en el Capítol 3, excepte que en aquest estudi la densitat cel·lular obtinguda fou inferior (4g/l). Sota aquestes condicions, tal i com era d'esperar, la biomassa formada i el CO₂ produït foren els únics productes detectats. Un cop s'assolí l'estat estacionari (reflectit en els valors constants dels paràmetres macroscòpics al llarg del temps), es calcularen les velocitats de consum de glucosa, metanol i oxigen, així com les velocitats de producció de biomassa i diòxid de carboni, a partir de les mesures de biomassa formada (pes sec), substrats residuals en el brou de cultiu i concentracions d'O₂ i CO₂ mesurades a la sortida de gasos del bioreactor (Taula 1).

Taula1. Consums i producció específics de *P. pastoris* creixent amb glucosa:metanol (80:20, pes:pes) com a font mixta de carboni en cultius en continu a una $\mu=0.09 \text{ h}^{-1}$. RQ, quocient respiratori. L'índex de consistència h fou inferior a 5, amb una redundància de 3 (95% nivell de significança).

Glucosa (mmol/g _{DCW} ·h)	Metanol (mmol/g _{DCW} ·h)	OUR (mmol/g _{DCW} ·h)	CER (mmol/g _{DCW} ·h)	Biomassa nCmol/g _{DCW} ·h)	RQ
-0.71 ± 0.01	-0.94 ± 0.02	-2.57 ± 0.03	2.03 ± 0.03	3.14 ± 0.04	0.79 ± 0.04

Anàlisi metabòlic

Donat que alguns estudis previs suggereixen que durant creixement amb metanol les cèl·lules modifiquen el gruix de la paret cel·lular [25], calgué validar aquest mètode utilitzant la mateixa temperatura de disrupció inicialment proposada (95 °C) amb diferents temps d'ebullició (3, 5, 7 i 10 minuts), incloent el proposat per el mètode pròpiament amb la finalitat d'observar quin temps òptim amb contacte amb l'agent extractor (Etanol 75%) és necessari per assegurar una ruptura total de les cèl·lules Figura 1.

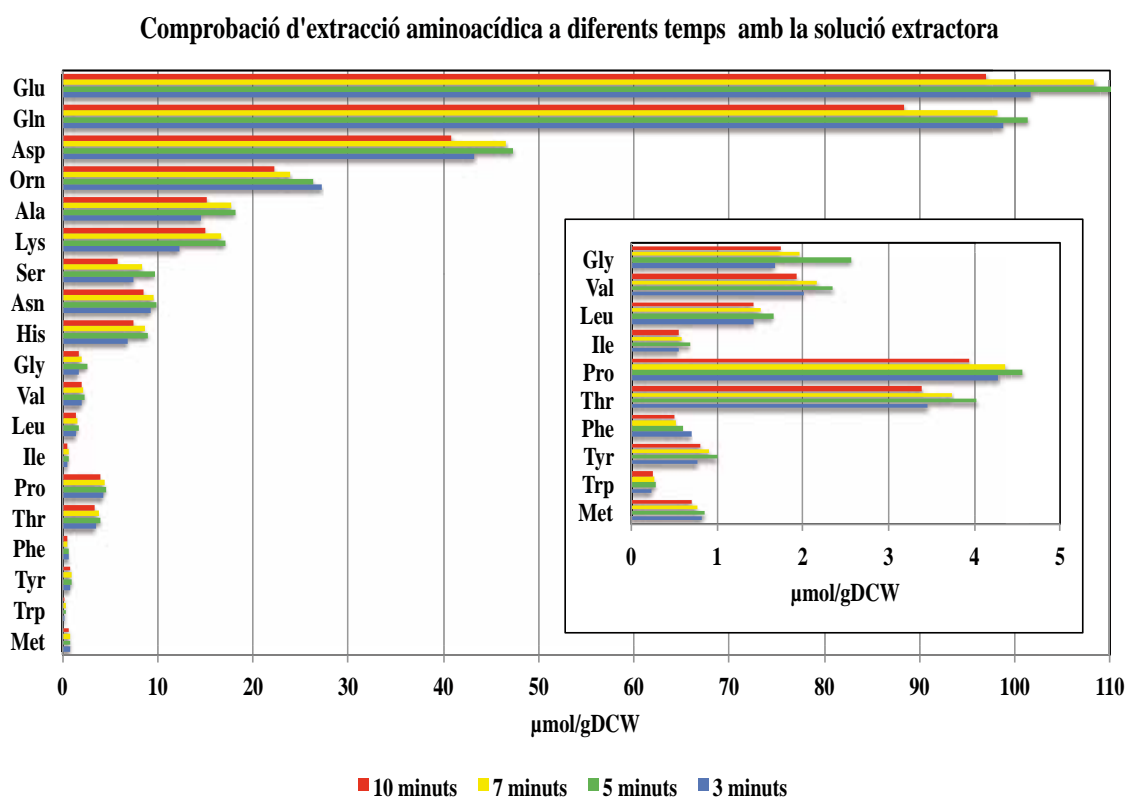


Figura 1. Concentracions intracel·lulars dels diferents pools d'aminoàcids de *P. pastoris* amb diferents temps d'exposició a l'agent extractor. L'agent extractor utilitzat fou una dissolució a 75% en volum d'etanol amb aigua destil·lada a 95°C de temperatura.

Tal i com s'observa en la figura anterior existeixen diferències amb el valor absolut del pool a diferents temps, obtenint la major concentració d'aquest a 5 minuts, que es el temps proposat per

Carnicer [7], utilitzant glucosa com a única font de carboni. Així doncs, s'utilitza aquest protocol durant els experiments de marcatge utilitzant metanol com a co-substrat. Aproximadament 1 ± 0.01 g del brou de cultiu fou ràpidament extret del bioreactor i immediatament mesclat amb 5 ml de la solució de parada metabòlica [7] prèviament refredada a -40°C per cadascuna de les mostres extretes.

En general, els valors de concentracions intracel·lulars obtinguts pels metabòlits del metabolisme central del carboni i aminoàcids (Figures 2, 3, 4 i Apèndix 3) foren comparables als descrits prèviament per a *P. pastoris* creixent en condicions anàlogues (medi de cultiu basal, velocitat de dilució) però amb glucosa com a única font de carboni utilitzant [7]. Les principals diferències observades s'observaren a la part alta de la glucòlisi, especialment amb els metabòlits glucosa-6-fosfat (Glc6P), fructosa-6-fosfat (Fru6P) i fructosa-1-6-bi-fosfat (FBP), les concentracions dels quals foren superiors en condicions de creixement amb la barreja glucosa:metanol. És interessant senyalar que el valor de xilulosa-5-fosfat (Xul5P) fou inferior en el cas de cèl·lules crescudes amb glucosa:metanol, indicant una clara influència de la activitat de la via d'assimilació del metanol.

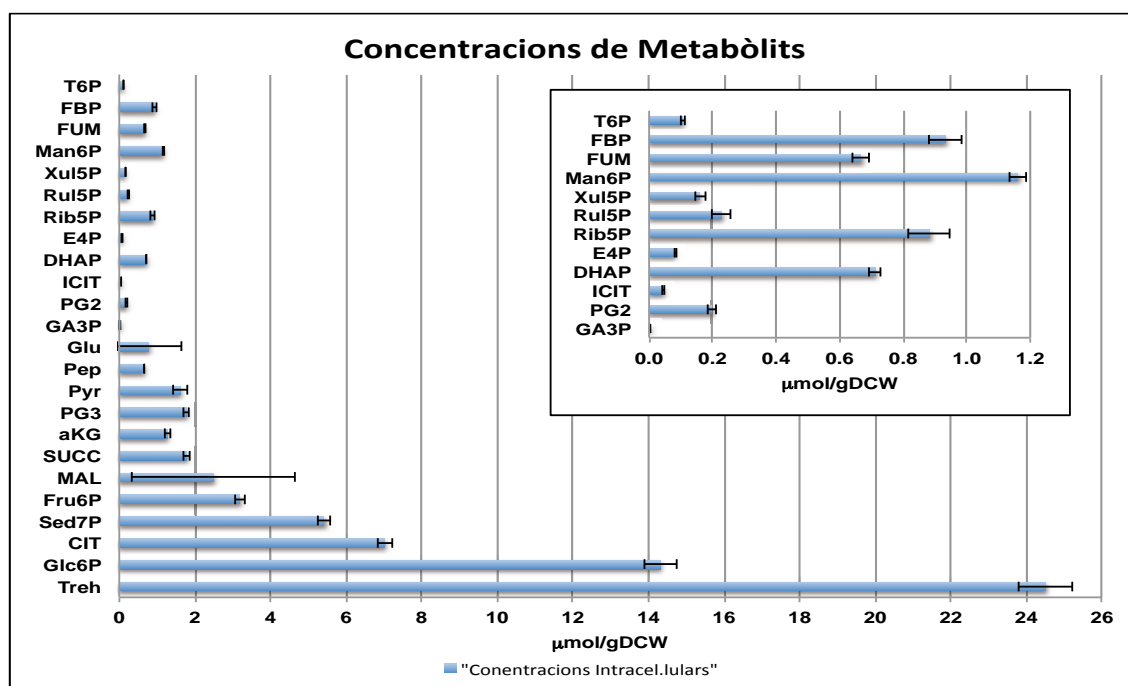


Figura 2. Concentracions intracel·lulars dels diferents metabòlits de *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb una barreja de glucosa:metanol com a font de carboni. Les concentracions s'expressen en $\mu\text{mol/gDCW}$.

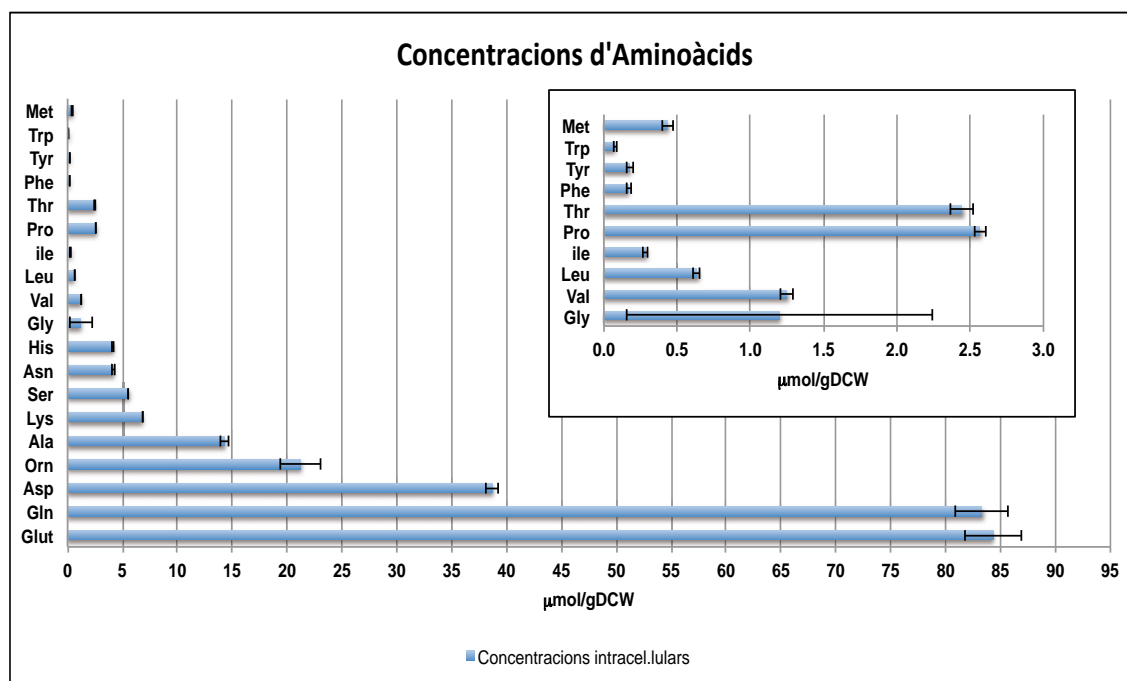


Figura 3. Concentracions intracel·lulars de metabòlits en *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb una barreja glucosa/metanol com a font de carboni. Les concentracions s'expressen en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$.

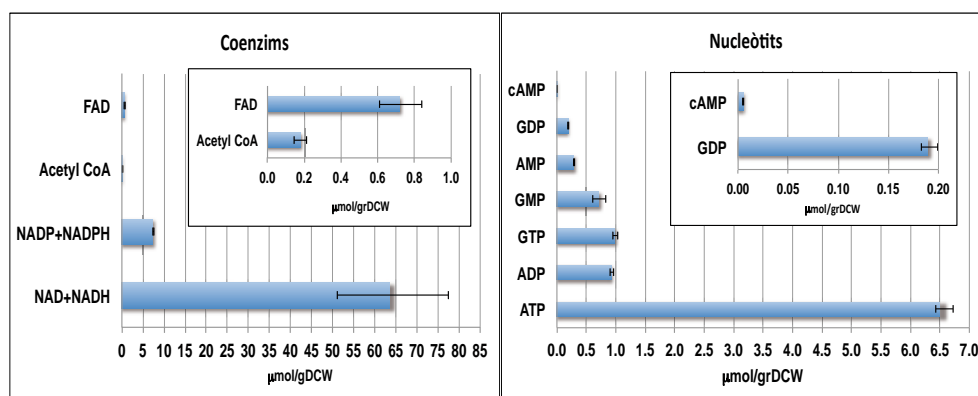


Figura 4. Concentracions intracel·lulars dels diferents *pools* de coenzims i nucleòtids en *P. pastoris* creixement amb glucosa/metanol.

Tal i com ja s'ha descrit en la secció de Materials i Mètodes, s'ha portat a terme una anàlisi de consistència termodinàmica per tal de validar el resultat de l'anàlisi metabolòmica [18] [20], el qual està basat en el principi que les concentracions intracel·lulars estan restringides per la segona llei de la termodinàmica, permetent direccionalitats específiques per les diferents reaccions metabòliques. Per a la realització d'aquesta anàlisi requerí considerar les següents suposicions:

- I) Es tingueren en compte la majoria de fluxos més rellevants del metabolisme central del carboni, (excepte el TCA) inclosos a la xarxa estequiomètrica metabòlica descrita en el Capítol 3), a més a més de la introducció de la reacció de la fructosa-1-6-bi-fosfatasa (FBPase).
- II) El citosol i el peroxisoma cel·lular s'agruparen com un compartiment únic.
- III) El valor dels diferents rangs dels metabòlits no mesurats foren restringits per els límits termodinàmics possibles.
- IV) L'impacte en el càlcul de la compartimentalització sub-cellular fou ignorada per els co-factors.

Cal destacar que la majoria de concentracions dels intermediaris metabòlics foren termodinàmicament consistents amb les direccionalitats de les reaccions incloses al model metabòlic. Només es trobà una petita excepció, la qual involucra els metabòlits de la branca no-oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat (Figura 5). La consistència termodinàmica d'aquesta via només es pogué aconseguir utilitzant una configuració diferent de les reaccions plantejades, concretament pel cas de la reacció de les transaldolases (Figura 6). Aquesta inconsistència ha estat descrita en diferents estudis metabolòmic de *S. cerevisiae* [26] [27] i *P. pastoris* [28] creixent amb glucosa. Aquesta inconsistència pot ser eliminada si es considerés la possibilitat d'incorporar reaccions alternatives com és el cas d'una reacció pont entre les reaccions formades per la transcetolasa i la transaldolasa. Aquesta possible reacció ($Xu5P + Rib5P \leftrightarrow Fru6P + E4P$) ens permet una distribució de fluxos metabòlics consistent amb les restriccions termodinàmiques derivades del valors dels diferents metabòlits intracel·lulars, tal i com s'ha proposat per a *S. cerevisiae* [27]. No obstant, cal remarcar que aquesta inconsistència no pot ser avaluada d'una forma precisa amb els valors obtinguts en aquest treball, tenint en compte els intervals de confiança de tots el paràmetres termodinàmics i el fet que la major part de reaccions relacionades amb les pentoses fosfat estan molt a prop de l'equilibri termodinàmic.

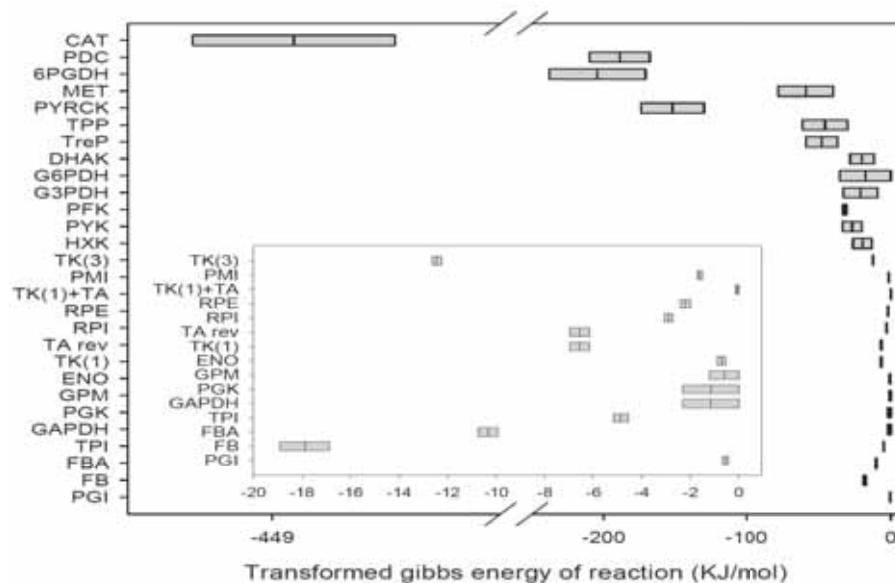


Figura 6. Energia lliure de Gibbs de les reaccions del citosol per a *P. pastoris* creixent amb glucosa/metanol com a font de carboni.

D'altra banda, per tal d'analitzar més detalladament el comportament d'algun dels punts o nodes de la xarxa metabòlica, se'n calcularen les relacions d'acció màssica (MAR) corresponents [18] (Taula 2). Sorprenentment, dos de les relacions calculades, corresponents a l'enolasa (ENO) i la fosfomanosa isomerasa (PMI), foren significativament diferents de les descrites anteriorment [21] [7]. El valor MAR calculat per la PMI en aquest estudi fou relativament inferior al descrit per la constant d'equilibri [29], suggerint una activitat inferior d'aquesta via quan s'utilitza una barreja de glucosa/metanol enlloc de glucosa com a font de carboni.

Les concentracions dels diferents *pools* d'aminoàcids calculades ens aquest estudi es varen comparar amb les mesures prèviament per la mateixa soca amb glucosa com a única font de carboni. Tot i que, a grans trets, la majoria de concentracions dels diferents aminoàcids segueix el mateix perfil descrit per a *P. pastoris* creixent amb glucosa com a única font de C, les concentracions d'aquests *pools* mesurades en cèl·lules crescudes amb una barreja glucosa/metanol foren generalment més reduïdes. Ara bé, aquestes diferències només foren significatives (amb un *p*-valor < 0.05) pels aminoàcids Typ, Met, His i Glu.

Les concentracions extracel·lulars de la majoria de metabòlits mesurats en cultius de substrats mixtes foren relativament inferiors comparades amb les mesures en treballs previs en condicions anàlogues però utilitzant glucosa com a única font de carboni. D'altra banda, dos dels metabòlits mesurats, la glucosa residual (extracel·lular o intracel·lular??) i trehalosa intracel·lular foren significativament superiors en les condicions d'aquest estudi.

Taula 2. Comparació de les relacions d'acció de masses entre diferents vies del metabolisme central sota diferents condicions de cultiu. PGI, fosfoglucosa Isomerasa; PMI, Fosfomanosa Isomerasa; ENO, Enolasa; FMH, Fumarasa.

Enzim	Relació d'acció de masses	<i>P. pastoris</i>		<i>S. cerevisiae</i>
		glucosa:metanol	glucosa ^a	glucosa ^b
PGI	Fru6P/Glc6P	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.11	0.26 ± 0.00
PMI	Man6P/Fru6P	0.36 ± 0.08	1.27 ± 0.06	1.18 ± 0.01
ENO	Pep/PG2	3.3 ± 0.29	1.67 ± 0.10	4.01 ± 0.09
FMH	MAL/FUM	3.7 ± 2.15	5.25 ± 0.38	5.15 ± 0.14

^aDades extretes de [7]

^bDades extretes de [29]

Temps d'intercanvi dels metabòlits principals del metabolisme de *P. pastoris*.

Un cop determinades les concentracions dels metabòlits intracel·lulars juntament amb la distribució de fluxos a través del metabolisme central, una estimació dels temps d'intercanvi d'aquets *pools* pot ser calculat (Figura 7). Aquests temps d'intercanvi donen una idea de la ràpida distribució del carboni per tota la xarxa metabòlica, però com es veu reflectit en la Figura 9 és necessari més temps per arribar a un intercanvi total del metabòlit en qüestió. D'altra banda, es interessant observar la

mateixa tendència que en la Figura 9 on els intermediaris del cycle dels TCA tenen un enriquiment més lent, fet que també és veu representat en aquesta última figura.

Sembla ser, que el perfil en el temps d'intercanvi per la soca X-33 creixent amb glucosa o glucosa-metanol segueix el mateix comportament, amb petites diferències en la part superior de la xarxa (glucòlisi), on es reflexa un major temps per el cas de glucosa com a única font de carboni, i en el cycle dels TCA on la co-assimilació de glucosa-metanol requereix de més temps per reemplaçar el contingut de carboni.

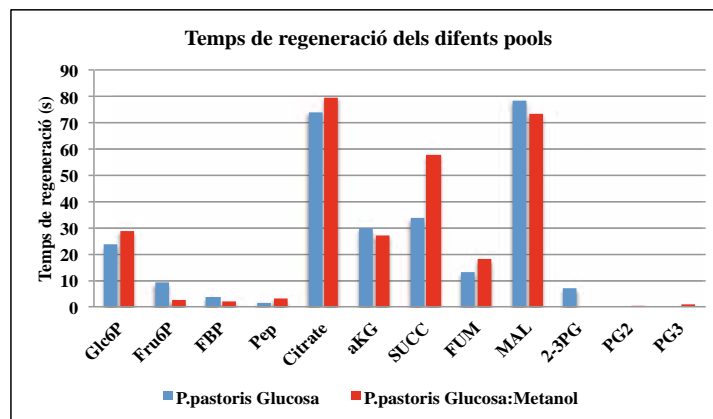


Figura 7. Temps de regeneració intracel·lulars per el metabolisme central de *P. pastoris* amb condicions d'alimentació de Glucosa (Carnicer 2011) i glucosa-metanol.

Marcatge dinàmic amb ¹³C i extinció de la xarxa metabòlica

Les distribucions d'isotopomers massics obtingudes després del pas de simulació es mostren en la Figura 7. Tal i com s'esperava l'enriquiment dels intermediaris del cycle dels TCA al igual que en els carbohidrats de reserva, com la trehalosa, mostren una lenta incorporació de carboni marcat comparat amb els metabòlits de la glucòlisi o la via de les pentoses fosfat. Tots els intermediaris glucolítics assoleixen un estat estacionari isotopomèric més o menys després de 15 minuts del canvi de substrat, amb variacions inferiors a 5% després de 4 hores de marcatge. S'ha de remarcar que, encara que aquest enriquiment és ràpid, és molt més lent que l'esperat basat amb els càlculs realitzats tenint en compte les concentracions de cada *pool* i el flux que circula a través d'aquest (Figura 6). Aquest retard en l'enriquiment ha estat observat en sistemes eucariòtics i pot ser explicat en la seva majoria pel flux d'intercanvi amb els polímers de reserva (trehalosa i glicogen) [30]. D'altra banda, a més d'aquest retard, s'observaren patrons de marcatge inesperats com és el cas de:

Glucosa-6-fosfat (Glc6P)

Les mesures d'aquets metabòlit son basades amb el fragment que conte els àtoms de carboni C₃-C₆, degut a la derivatització anteriorment comentada. Cal remarcar dues observacions diferents pel que fa a l'enriquiment d'aquest metabòlit. Comparant els resultats amb altres condicions experimentals,

l'enriquiment ^{13}C en la Glu6P és superior a l'esperat a partir del seu metabòlit precursor, la glucosa extracel·lular.

Basant-nos en la composició del medi subministrat (20% $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$, 80% $[\text{1-}^{13}\text{C}_1]$ glucosa), el fragment $\text{C}_3\text{-C}_6$ hauria d'estar un 80% no marcat i un 20% totalment marcat. A més, la fracció m_{+0} i m_{+1} assoleixen valors inesperats propers al 14% en l'estat estacionari isotopomèric. D'igual manera, els fragments m_{+2} i m_{+3} assoleixen valors del 10% i 8%, respectivament. Aquestes masses (+1, +2 +3) son clarament provinents de la fixació de metanol. Concretament, el patró del DHAP mostra un ràpid increment en la fracció de massa m_{+1} , la qual entra al *pool* de Fru6P (via GA3P i la ruta reversible de les pentoses fosfat), i finalment cap a Glc6P (via la possible reacció reversible de la PGI). D'altra banda, una altra possible via alternativa de formació d'aquests fragments m_{+1} i m_{+2} , pot ser l'activitat metabòlica combinada de la fructosa-bifosfat-aldolasa i la FBPassa, les quals poden retornar el C_1 marcat dins el C_6 marcat de la FBP (C_1 marcat en el DHAP \rightarrow C_3 marcat en el GA3P \rightarrow C_1 o C_6 marcat en la FBP). Posteriorment, l'activitat de la FBPassa s'encarrega de traspasar aquest patró de marcatge a la fructosa-6-fosfat [31]. Finalment, cal mencionar que el patró de marcatge de la Fru6P és pràcticament idèntic al patró mostrat per la Glc6P, indicant un flux d'intercanvi elevat de la PGI.

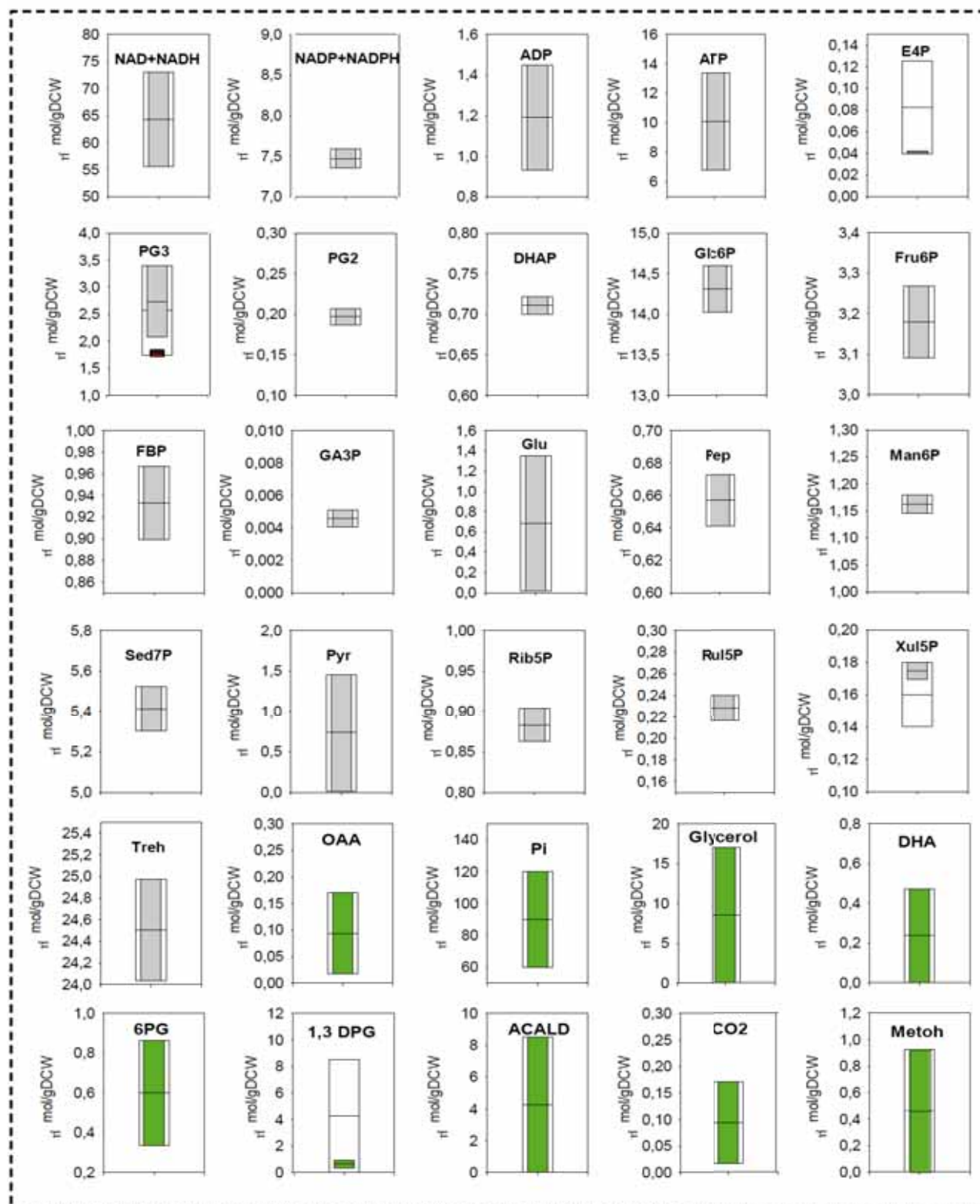
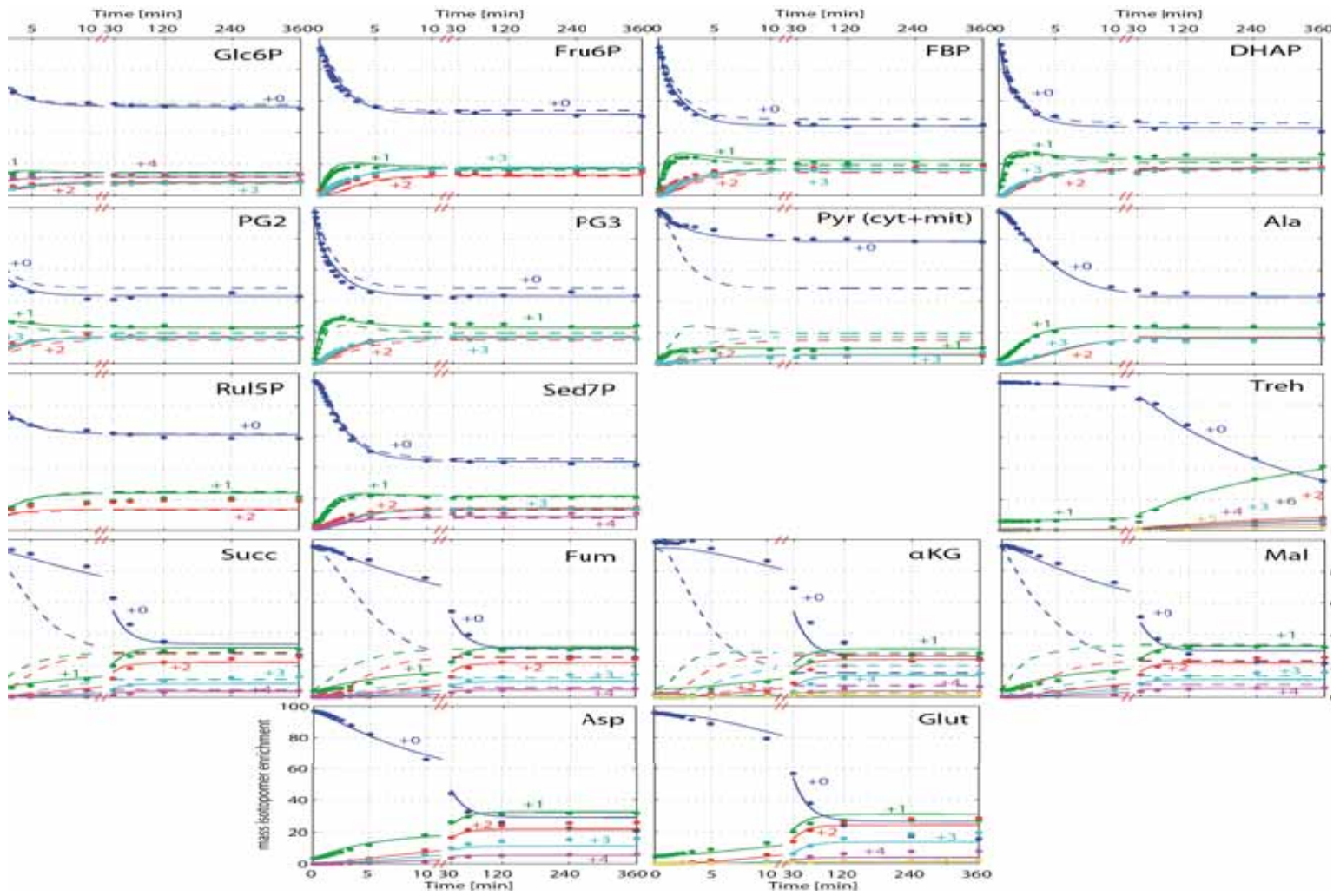


Figura 8. Rang de concentracions dels metabòlits mesurats i rang més probable dels metabòlits no mesurats. La barres en blanc representen el rang prèviament considerat per el càlcul, les barres amb gris (metabòlits mesurats) i les barres amb verd (metabòlits no mesurats) representen els rangs de valors possibles d'acord amb les restriccions termodinàmiques aplicades per el programa. Si existeix una quantificació errònia d'algun metabòlit, el rang original mesurat (barres amb vermell) i els rangs de concentració avanç i després de l'anàlisi NET es mostren conjuntament.



dinàmica dels isotòmers massics dels metabòlits principal de *P. pastoris* en cultiu amb continu després del canvi de medi ^{12}C representats en cercles sòlids. Línies contínues reflecteixen la simulació amb la millor estimació de flux utilitzant el model este en aquest capítol i les línies puntejades representen la simulació amb la millor estimació utilitzant el model definit en el Capítol 3.

Encara que la dinàmica de marcatge del *pool* de la Glc6P és elevat, cal introduir un flux d'intercanvi amb els carbohidrats de reserva (en aquest cas la trehalosa). La trehalosa mostra un clar perfil d'enriquiment, molt més ràpid que si fos comparat amb un flux net de síntesi (velocitat de síntesi a $\bar{\mu} = 0.09\text{h}^{-1}$), indicant una clara síntesi i degradació simultànies de la trehalosa..

Tenint en compte aquestes observacions, tant la síntesi i degradació de la trehalosa com la reacció de la FBPasa, s'inclogueren en la xarxa metabòlica, reduint així la diferència entre la cinètica dels enriquiments ¹³C mesurats i la els simulats en la part alta de la glucòlisi (Figura 9).

Piruvat

L'enriquiment del piruvat és clarament més lent que si el comparem amb el seu precursor PG2. És conegut que l'alanina transaminasa pot alentir el patró de marcatge del piruvat degut al gran *pool* d'alanina comparat amb el *pool* de piruvat i l'acoblament directe entre aquests dos *pools* amb un sol pas de reacció. D'altra banda les mesures extremes clarament indiquen que no és possible que l'alanina sigui la única font que ocasiona aquest alentiment en l'enriquiment del piruvat, ja que l'enriquiment de l'alanina és per ell mateix més ràpid que el pròpiament mesurat en el *pool* del piruvat. Tanmateix, esta assumit que l'enriquiment mesurat en el piruvat és la conseqüència de les diferents contribucions de marca provinents de la compartimentació (citosol i mitocòndria) conjuntament més algun flux d'intercanvi de material ¹²C en la mitocòndria, encara avui dia desconeguda. Aquesta suposició es consistent degut a que tots els aminoàcids (valina, leucina, isoleucina) connectats amb el node del piruvat mitocondrial mostren enriquiments més lents que l'alanina i que el pròpiament enriquiment 'total' del piruvat.

Així doncs, seguint aquesta hipòtesi de reaccions d'intercanvi desconegudes, s'introduí una entrada de ¹²C, la qual produeix piruvat mitocondrial, juntament amb una sortida d'igual capacitat per mantenir el balanç de carboni global inalterable. Encara que aquesta aproximació no és mecànica, ens permet estimar el flux d'intercanvi per exemple amb els components de la biomassa en aquest node concret [31]. Aquesta entrada de carboni ¹²C en el *pool* de piruvat mitocondrial fou estimada de ser al voltant de 1.2 mmol/g_{DCW}·h. Sense aquesta reacció d'entrada de material no marcat, el patró d'enriquiment del piruvat no podria ser reproduït.

D'altra banda, cal esmentar que aquest flux d'intercanvi podria tenir un impacte en el balanç energètic cel·lular (ATP) sent la resposta de la síntesi i degradació d'aminoàcids com els procedents de la família de la valina els quals representarien un cycle que consumiria ATP.

Intermediaris del cycle dels àcids tricarbòxilics (TCA)

En aquest cas la reproducció de l'enriquiment mesurat en el cycle dels TCA fou millorat tenint en compte les reaccions següents:

- I) Reaccions del *bypass* de la piruvat deshidrogenasa (PDH) (emp9 i emp12).

- II) Fluxos d'intercanvi α -cetoglutarat \leftrightarrow Glu (aa_glu) i Oxalacetat \leftrightarrow Asp (aa_asp), els quals reflexant una capacitat tamponada dels diferents pools d'aminoàcids (grans *pools* que estant en constant intercanvi amb metabòlits del metabolisme central menys concentrats) puguin estar estretament relacionats amb la llançadora redox Malat/Aspartat [32].
- III) Reacció de l'aspartat amoni liasa la qual converteix Asp en fumarat (tca8) resultant en la formació de NH_4 , puguin reflectir l'activitat de les reaccions de transaminació i la renovació de les proteïnes cel·lulars. Aquest flux no fou completament ben definit ja que en el cicle dels TCA es té en compte un altra ruta paral·lela reversible, la qual pot afectar el valor absolut del fluxos (tca7 i tca6).

Encara que el flux a través del *bypass* de la PDH no es considerà en el model metabòlic inicial (de fet, fou inclòs en la reacció de la PDH (Capítol 3)), la seva activitat no hauria de ser exclosa del model tenint en compte que en llevats Crabtree negatius aquesta via està descrita com activa.

S'ha de remarcar que en estudis previs utilitzant com a model metabòlic el llevat *S. cerevisiae* no s'observa la síntesis de carnitina la qual és essencial per l'enzim carnitina acetil-transferasa que realitza el transport d'Acetil-CoA citosòlic (ACCoA) cap a la mitocondria. D'altra banda una via completa de biosíntesis de carnitina a estat caracteritzada en *Candida albicans* amb els seus corresponents 4 gens [33].

Interessantment, en el genoma de *P. pastoris* s'han descobert gens suposadament homòlegs als descrits per *Candida albicans* [34] [35] els quals han estat provats de ser transcripcionals actius [36].

Finalment, si observem el temps necessari per assolir un estat isotòpicament estable, els metabòlits del cicle dels TCA mostren un retard major (Figura 9), així com una dinàmica d'enriquiment més lenta comparat amb els intermediaris glicolítics. Intercanvis de carboni a causa de les transaminacions o bé per la síntesis / degradació de proteïnes pot ocasionar una reducció en la velocitat d'enriquiment tal i com és descrit per estudis de simulació amb marcatge ^{13}C amb cultius en continu utilitzant el llevat *S. cerevisiae* [37].

Reaccions reversibles

Algunes reaccions de la via glucolítica, de la ruta de les pentoses fosfat o el cicle dels àcids tricarbòxics, són conegudes per ser generalment reversibles en condicions fisiològiques, mostrant una mateixa patró de marcatge ^{13}C entre cadascun dels seus corresponents substrats o productes, fet que a la vegada suggereix un elevat flux d'intercanvi entre aquests dos compostos. Tal i com s'ha estat discutint anteriorment, els patrons de marcatge de la Fru6P i la FBP són pràcticament idèntics, suggerint que ambdós enzims, la fosfofructoquinasa i la fructosa-1-6-bisfosfatasa, estan actius quan *P. pastoris* creix en condicions carboni-limitants, co-assimilant glucosa i metanol. Per tant, s'introduïren totes dues reaccions d'intercanvi en el model metabòlic.

Per avaluar l'impacte de les extensions i reversibilitats d'algunes reaccions assumides en el model utilitzat en aquest capítol, es compara el resultat obtingut de la simulació amb una simulació utilitzant el model metabòlic descrit en el Capítol 3. Tal i com es pot observar en la Figura 9 (línia discontinua), el model original no permet un ajust acceptable dels enriquiments isotòpics mesurats.

En canvi, amb el model estàtic, l'ajust aconseguit de les mesures realitzades és estadísticament acceptable, basat amb el criteri de la χ^2 descrit en l'apartat de materials i mètodes.

Fluxos obtinguts mitjançant l'anàlisi de fluxos metabòlics en condicions de marcatge isotòpic no-estacionàries (INST) ¹³C-MFA

Els resultats de les dues simulacions discutides anteriorment juntament amb les mesures dels isotopomers massics obtinguts mitjançant LC-MS i GC-MS (Apèndix 3), s'utilitzaren posteriorment pel càlcul de les distribucions de fluxos metabòlics a través del metabolisme central de *P. pastoris* sota condicions de co assimilació de glucosa/metanol.

Tenint en compte que l'actual metodologia per la quantificació metabòlica no ens permet la lectura directa de la informació continguda en els patrons de marcatge ¹³C dels metabòlits localitzats en diferents compartiment cel·lulars (intermediaris del cicle dels TCA), els valors extrets amb GC-MS dels isotopomers massics, reflecteixen el valor mig del metabòlit concret en tot el volum cel·lular. Així doncs, el model descrit en aquest estudi no contempla la compartimentalització del metabolisme. Tot i tenir aquesta limitació metodològica, la informació dels patrons de marcatge d'alguns metabòlits sintetitzats a partir de pools compartimentats ens proveeixen d'informació addicional dels seus precursors (alguns aminoàcids sintetitzats a partir del *pool* de piruvat mitocondrial o citosòlic i alguns intermediaris de cicle dels TCA), així com reaccions de transport entre compartiments cel·lulars (llançadores redox mitocondrials).

Generalment, la distribució total del patró de carboni a través de la xarxa descrita (Figura 8), es similar al patró de flux descrit utilitzant dades ¹³C d'aminoàcids proteics amb la metodologia NMR (Capítol 3), d'aquesta forma es corrobora el formalisme matemàtic descrit per tal de calcular les relacions de flux metabòlic per les vies d'assimilació de metanol (Capítol 3). Concretament, seguint el comportament dels nodes principals de la xarxa descrita observem que:

- I) La major part del flux que flueix per el pool de Glc6P entra en la via oxidativa de les PPP (77% comparat amb el 57% calculat en el Capítol 3 utilitzant un conjunt de dades provinent de anàlisis NMR).
- II) La majoria del metanol assimilat 54% es directament oxidat cap a CO₂, valor inferior que l'obtingut en el capítol 3 (79%).
- III) Existeixen grans fluxos d'intercanvi per l'oxalacetat, malat, aspartat i glutamat indiquen una capacitat tamponada dels aminoàcids així com una activitat de la llançadora Malat/Aspartat important, no descrita prèviament.
- IV) El *pool* de trehalosa es el responsable del reciclatge del 1.5% del flux d'entrada de glucosa.

Cal esmentar que la diferència observada en la distribució del metanol podria ser explicada per la diferència observada entre els dos experiments degut als diferents consums específics de metanol (q_{Met}). Aquest flux fou inferior en els experiments realitzats en aquest capítol comparat amb els realitzats en el capítol 3, (-0.94 ± 0.02 mmol/g_{DCW}·h amb -1.15 ± 0.06 mmol/g_{DCW}·h respectivament), com a resultat de una menor relació $q_{Metanol}/q_{Glucosa}$. Tenint en compte que la via

d'oxidació cap a la formació de CO₂ pot ser considerada com una via de desintoxicació, per tal d'eliminar el formaldehid i l'àcid fòrmic, consums menors de metanol poden tenir com a resultat en menor activitat de la via dissimilatòria [38] [39].

L'intercanvi de flux elevat al voltant de l'oxalacetat, el malat, l'aspartat i el glutamat podria indicar, comentada anteriorment, una activitat important de la llançadora Malat/Aspartat [32]. Aquesta suposició és coherent amb els resultats obtinguts a partir de dades extretes dels diferents experiments de marcatge amb posterior anàlisi mitjançant NMR [36] (Capítol 3 d'aquesta tesi), on la fracció mesurada d'enllaços intactes C₂-C₃ de l'oxalacetat foren aproximadament idèntiques tant per el pool mitocondrial com per el *pool* citosòlic. Les dades extretes amb aquesta metodologia també ens indiquen una alta reversibilitat de les interconverció del oxalacetat citosòlic amb diferents intermediaris citosòlics del cicle dels TCA, reafirmant la participació de l'aspartat, i de la llançadora redox del malat per realitzat el transport d'equivalents de reducció a través de la membrana mitocondrial.

Encara que la distribució real de fluxos al voltant del model del piruvat no esta del tot clara, requerint experiments addicionals, el conjunt de dades extretes mitjançant MS clarament suporten una activitat significativa de la PDH (un 30% del ACCoA mitocondrial podria ser importat a partir del *pool* citosòlic), el qual no fou possible de discriminar utilitzant un anàlisi en estat estacionari basat en restriccions amb ¹³C-NMR.

Es important destacar que, l'anàlisi de flux basat en MS, ens a proporcionat nous coneixements sobre parelles de reaccions bidireccionals. En particular, les dades procedents de les anàlisis de MS reflectiren un flux gluconeogènic a través de la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i la gliceraldehid fosfat (GA3P) cap a la formació de Glc6P. A més a més, aquest flux gluconeogènic ha resultat ser termodinamicament consistent amb les mesures dels diferents metabòlits pertanyent a la via de la glucòlisi (Figura 6 i Figura 7).

Així doncs, la combinació de l'anàlisi metabolòmic juntament amb el conjunt de dades extretes basades en MS, poden ser molt més precisos en la determinació de les direccionalitats o reversibilitats del flux al igual com l'estequiometria en la branca no-oxidativa de la via de les pentoses la qual, s'ha descrit de ser particularment complicada de determinar acuradament en estudis previs amb co-alimentació amb metanol utilitzant relacions de fluxos tal i com és comenta en el capítol anterior [40]. Els fluxos determinats en el cicle dels TCA mostren una incertesa més elevada que en la resta de la xarxa, ja que les transicions després del node del piruvat son relativament lentes. L'estimació del valor del flux absolut ens suggereix fluxos d'intercanvis molt elevats degut a que els patrons d'enriquiment son similars en tots els metabòlits del cicle, amb l'agregant de la lenta dinàmica d'enriquiment la qual ocasiona poca precisió en la determinació del valor final (desviacions estàndard elevades).

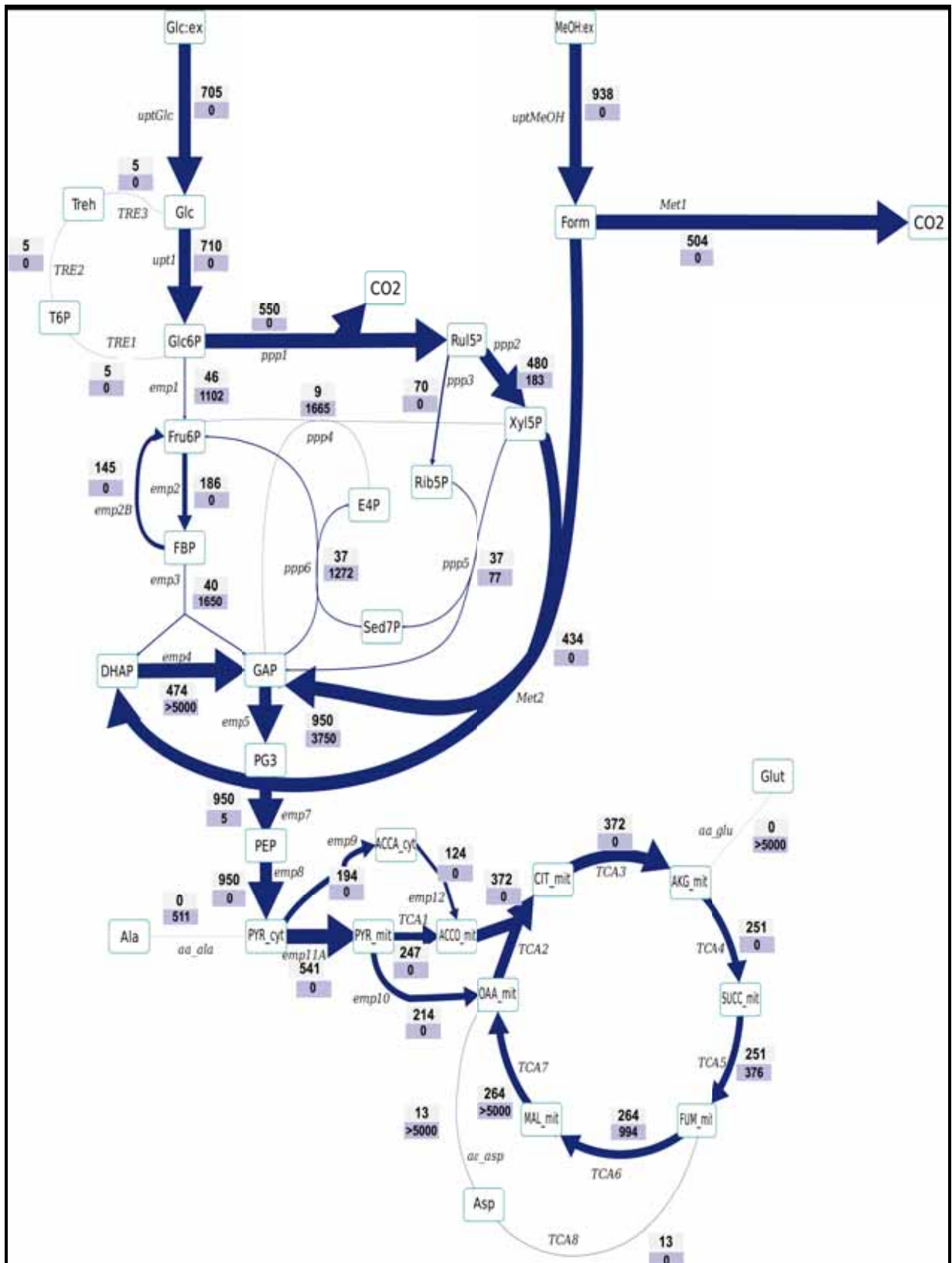


Figura 10. Distribució de fluxos metabòlics basada en l'experiment de marcatge isotòpic no estacionari amb ¹³C i la xarxa metabòlica ampliada. Tots els fluxos son donats en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$. el valor superior representa el flux net en la direcció de les fletxes, el valor inferior representa el valor del flux reversible (en valor absolut). Tots els valors dels fluxos estan representats en l'Apèndix 4.

Generació i consum de cofactors

Tenint en compte l'estimació de fluxos basats en marcatge ^{13}C (en la solució dels quals solament es tingué en compte el balanç de carboni juntament amb substrat marcat) s'ha reconstruït el balanç de cofactors utilitzant el model estequiomètric descrit en aquest capítol (Apèndix 1) incloent-hi la majoria de cofactors com ATP, NADH i NADPH.

NADPH

Tal i com s'observa en el Capítol 3 d'aquest treball, la co-assimilació de metanol té un impacte significatiu en la distribució de fluxos entre la via glucolítica i la via oxidativa de les pentoses fosfat. Es canalitza substancialment més carboni per aquesta darrera via quan les cèl·lules creixen amb una barreja glucosa/metanol que quan utilitzen amb glucosa com a única font de carboni. Conseqüentment, el flux de regeneració de poder reductor (NADPH) per la branca oxidativa de les PPP és superior en el cas glucosa-metanol que en el de glucosa [28] (1.1 ± 0.1 contra 0.85 ± 0.04 mmol/g_{DCW}·h, respectivament). En principi, donat que la ruta de les PPP és la via principal de formació de NADPH citosòlic, el flux a través de la branca oxidativa està directament correlacionat en la demanda biosintètica d'equivalents de reducció [41]. Tanmateix, la co-assimilació de glucosa-metanol no resulta en un increment dels rendiments biomàssics comparats amb el creixement sota condicions amb glucosa pura com a font de carboni (Capítol 3). Aquest fet, ens suggereix que s'ha de generar una demanda extra de NADPH en algun punt del metabolisme. De fet, els requeriments de NADPH biosintètics calculats en aquest treball foren de 0.97 ± 0.07 mmol/g_{DCW}·h. Tot i que aquest valor no és significativament diferent, és lleugerament inferior al total de NADPH generat en la via de les pentoses. En canvi, la demanda d'equivalents biosintètics per cèl·lules creixent amb glucosa com a única font de C fou exactament el generat en la branca oxidativa de les pentoses. És interessant senyalar que alguns llevats Crabtree negatius semblen tenir algun altre mecanisme involucrat en la re-oxidació del NADPH produït en la PPP, per exemple mitjançant deshidrogenases mitocondrials externes alternatives, les quals utilitzen com a substrat el NADPH [42]. D'altra banda quan el llevat *Pichia augussta* és cultivat amb glucosa en cultius discontinus alimentats, es produeix un excés d'un 40% de NADPH en relació als requeriments per la síntesis de biomassa, suggerint la presència encara desconeguda d'algun mecanisme de re-oxidació del NADPH en la cèl·lula [41]. Observant aquestes similituds, es podria especular que aquest podria ser també el cas de *P. pastoris* quan co-assimila glucosa i metanol, per exemple observant la via d'intercanvi de flux entre α -cetoglutarat i el glutamat. Un altra possible explicació d'aquesta sobre generació de NADPH podria estar relacionada amb els requeriments per la síntesis de glutatona, metabòlit clau involucrat en el primer pas de l'oxidació del metanol cap a CO_2 .

Finalment, un intercanvi amb la síntesis o degradació de les proteïnes també podria tenir un impacte en el potencial reductor. El flux estimat per l'aspartat liasa podria indicar un intercanvi amb les proteïnes i com a conseqüència un consum de NADPH.

NADH

D'igual forma que en cas anterior, es calculà la regeneració de NADH a partir de l'estequiometria de les reaccions de la xarxa juntament amb els fluxos nets, obtenint un valor de 4.37 ± 3.62 mmol/g_{DCW}·h, dins el rang prèviament calculat en el Capítol 3 utilitzant la metodologia de ¹³C-NMR. Assumint que tots els equivalents de reducció NADH que no han estat consumits per l'estequiometria de la xarxa son reciclats a través de la cadena respiratòria, es calculà el consum teòric d'oxigen. Aquest valor representa el 94 % del valor d'oxigen mesurat durant els experiments mesurat (qO₂), fet que demostra que no s'observa cap desequilibri important que porti a hipotetitzar la presència d'una activitat NADPH deshidrogenasa o NADPH → NADH transhidrogenasa.

Globalment, s'obtingueren resultats equivalents per els diferents valors de pH, excepte per la relació mínima de NAD⁺/NADH tal i com s'esperava. Sorprenentment, aquesta relació va ser calculada en base a l'anàlisi termodinàmic amb les dades de metabolòmica mesurades en aquest estudi utilitzant el programa anNET fou al voltant de 1300 (assumint un pH intracel·lular de 7.2), el qual es 13 cops superior a la relació calculada per a *P. pastoris* sota condicions de creixement amb glucosa com a única font de carboni (Taula 3). Aquesta relació, ens suggereix que la generació de NADH deguda a l'activitat de la formaldehid i format deshidrogenasa en el citosol es eficaçment re-oxidada ja sigui per alguna NADH deshidrogenasa localitzada en la paret externa de la mitocòndria o transportada cap a la mitocòndria per l'acció d'alguna llançadora redox, tal i com s'ha comentat anteriorment.

ATP

La distribució de fluxos metabòlics calculats en aquest estudi ens permet estimar la quantitat d'energia ATP generada o consumida, ja sigui pel creixement o pel manteniment cel·lular. Així doncs, l'energia total generada per *P. pastoris* ha estat de 8.6 ± 3.6 mmol ATP/g_{DCW}·h. Part d'aquesta energia es generada per la fosforilació a nivell de substrat, mentre que la resta és generada per la via de la fosforilació oxidativa (respiració). Cadascun d'aquests termes es pot calcular directament a partir de l'estequiometria de la xarxa utilitzada i del valor net dels fluxos calculats. En aquest cas, la respiració proporcionà, un 75% del total d'energia generada per la cèl·lula valor molt semblant 60% al descrit per *S. cerevisiae* amb glucosa pura en condicions aeròbiques [43].

L'estimació dels requeriments de manteniment (despesa d'energia no associada al creixement cel·lular) fou de 2.7 ± 3.6 mmol ATP/g_{DCW}·h. L'eficàcia de la fosforilació oxidativa o "*P/O ratio*", és a dir, la quantitat d'ATP produït a partir del moviment de dos electrons a través d'una cadena d'electrons definida, donant lloc a una reducció d'un àtom d'oxigen es fixà a un valor de 1.48 mols ATP/molO, basat en dades bibliogràfiques de *S. cerevisiae* [44]. Considerant aquesta mateixa relació P/O, Chung i col·laboradors estimen uns requeriments de 2.3 i 6 mmol ATP/g_{DCW}·h per a *P. pastoris* creixent amb glucosa i amb mesclades de glicerol-metanol, respectivament [45]. Estudis recents amb el llevat *P. pastoris* mitjançant models metabòlics a escala genoma [44] descriuen que requeriments d'energia per la síntesis de biomassa son fortament dependents de la font de carboni utilitzada. En aquest estudi, la generació total d'energia (generació d'ATP) calculada per als casos de glucosa i glicerol com a fonts úniques de C fou de 70-76 mmolATP/g_{DCW} respectivament, mentre que pel cas de metanol s'estimà un valor de 150 mmolATP/g_{DCW}, significativament més

elevat. Així doncs, la generació de ATP calculada per *P. pastoris* creixent en cultius en continu a una D de 0.1 h^{-1} és de 7 i 15 $\text{mmolATP/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$ per glucosa i metanol, respectivament. És interessant assenyalar que aquest rang inclou el valor calculat en aquest treball de 8.6 $\text{mmolATP/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$.

Tenint en compte el rang de valors de generació d'ATP anteriorment comentats calculat en el treball de Caspeta i col·laboradors [44], es pot concloure que el valor calculat en aquest treball sota condicions de creixement amb mescles de glucosa-metanol com a font de carboni sembla estar dins les estimacions prèviament realitzades pel llevat *P. pastoris*.

Conclusions

En aquest capítol, hem aplicat per primer cop la tècnica de marcatge ^{13}C -MFA basada en dades de marcatge isotòpic mesurades mitjançant MS obtingudes en condicions dinàmiques al cas de *P. pastoris* co-assimilant glucosa-metanol. Concretament la distribució de fluxos obtinguda amb aquesta metodologia fou coherent amb l'obtinguda en el capítol 3 utilitzant marcatge ^{13}C amb dades extrems d'aminoàcids proteics.

Amb la utilització de la metodologia ^{13}C -MFA basada en experiments de marcatge isotòpic en condicions dinàmiques (INST), el càlcul de distribució metabòlica de fluxos fou estesa a una xarxa amb un nombre major d'equacions on les possibles reversibilitats en la via glucolítica/gluconeogènica, el cicle dels àcids tricarboxílics i la via de les pentoses fosfat fou determinada. A més, aquesta metodologia ha permès millorar la precisió en el càlcul de la distribució de fluxos a través de la via d'assimilació de metanol, ja que s'ha mesurat el patró de marcatge d'alguns metabòlits directament sintetitzats a partir d'aquesta via (DHAP, GA3P i metabòlits de les PPP).

La combinació de les dades de l'anàlisi metabòlica juntament amb els fluxos metabòlics calculats mostren una consistència termodinàmica la qual valida encara més els resultats obtinguts. Les direccionalitats dels fluxos resultaren ser plenament consistents quan s'utilitza una topologia alternativa per la branca no oxidativa de les pentoses fosfat, concretament, quan es considera la canalització metabòlica entre les reaccions de les transquetolases i les transaldolases.

L'excés de producció de NADPH, juntament amb la incertesa en el balanç de NADH i l'increment de requeriments d'ATP respecte la utilització de glucosa com a única font de carboni per al manteniment cel·lular sota condicions de co-alimentació glucosa/metanol, podrien ser indicatius d'un increment del reciclatge de les proteïnes. En aquest sentit, caldria realitzar experiments específics utilitzant ^{15}N , per tal d'investigar el metabolisme de proteïnes en aquestes condicions fisiològiques.

Apèndix

Apèndix 1

1.1 Reaccions estequiomètriques aplicades a la metodologia INST-¹³C-MFA. Els valors de CO₂, O₂ i els cofactors no s'utilitzaren per als càlculs de balanços de fluxos.

Metabolisme del Metanol

80. Metoh => Form
81. Form => FOR + NADH
82. FOR + NAD⁺ => NADH + CO₂
83. Xul5P + FOR + ATP => ADP + GA3P_{per} + DHA
84. GA3P_{per} => GA3P
85. DHA => GA3P

Glucòlisi i gluconeogènesi

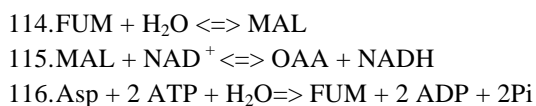
86. Glc_{ext} + 2 ATP <=> Glc6P + 2 ADP
87. Glc6P <=> Fru6P
88. Fru6P + 1 ATP => FBP + 1ADP
89. FBP => Fru6P + Pi
90. FBP <=> DHAP + GA3P
91. GA3P + ADP + Pi + NAD⁺ => PG3 + ATP + NADH
92. PG3 + ATP + NADH => GA3P + ADP + Pi + NAD⁺
93. PG3 <=> Pep
94. Pep + ADP => Pyr + ATP
95. Pyr + NAD⁺ => ACCoA_{mit} + CO₂ + NADH
96. Pyr + NAD⁺ => ACCoA_{cyt} + CO₂ + NADH
97. Pyr + CO₂ + ADP => OAA + ATP
98. 2 Glc6P + UTP + H₂O => H⁺ + 2 Pi + UDP + T6P
99. T6P + H₂O => Pi + Treh
100. Treh + H₂O => 2 Glc6P

Via de les Pentoses Fosfat (PPP)

101. Glc6P + 2 NADP⁺ => Rul5P + 2 NADPH + CO₂
102. Rul5P <=> Rib5P
103. Rul5P <=> Xul5P
104. Rib5P + Xul5P <=> Sed7P + GA3P
105. Sed7P + GA3P <=> Fru6P + E4P
106. Xul5P + E4P <=> Fru6P + GA3P

Cicle dels àcids tricarboxílics (TCA)

107. ACCoA_{mit} + OAA => CIT
108. CIT => ICIT
109. ICIT + NAD⁺ => αKG + CO₂ + NADH
110. αKG + NAD⁺ => SUCCoA + CO₂ + NADH
111. SUCCoA + Pi + ADP => SUCC + ATP
112. SUCC + ATP => SUCCoA + ADP + Pi
113. SUCC + NAD⁺ => FUM + NADH



Biosíntesis d'aminoàcids, interconverció d'unitats C_1 , reaccions de transport i cadena respiratòria (reaccions iguals a les descrites en el Capítol 3)

Síntesis de Biomassa (Proteïna, Carbohidrats, Lípids, DNA i RNA (equacions iguals a les del Capítol 3)

1.2 Xarxa de reaccions utilitzades per l'anàlisi termodinàmica amb al programa anNET.

<u>Abreviatura</u>	<u>Reacció</u>
HXK	$\text{Glc}_{\text{int}} + \text{ATP} > \text{Glc6P} + \text{ADP}$
PGI	$\text{Glc6P} \leftrightarrow \text{Fru6P}$
PFK	$\text{ATP} + \text{Fru6P} > \text{ADP} + \text{FBP} + \text{h}$
FB	$\text{FBP} + \text{h}_2\text{o} > \text{Fru6P} + \text{P}_i$
FBA	$\text{FBP} \leftrightarrow \text{DHAP} + \text{GA3P}$
TPI	$\text{DHAP} \leftrightarrow \text{GA3P}$
GAPDH	$\text{GA3P} + \text{NAD} + \text{pi} \leftrightarrow \text{h} + \text{NADH} + 13\text{dpg}$
PGK	$13\text{dpg} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{PG3} + \text{ATP}$
GPM	$\text{PG3} \leftrightarrow \text{PG2}$
ENO	$\text{PG2} \leftrightarrow \text{h}_2\text{o} + \text{Pep}$
PYK	$\text{ADP} + \text{h} + \text{Pep} > \text{ATP} + \text{Pyr}$
G6PDH	$\text{Glc6P} + \text{NADP} > \text{PG6} + \text{h} + \text{NADPH}$
6PGDH	$\text{PG6} + \text{NADP} + \text{h}_2\text{o} > \text{Rul5p} + \text{NADPH} + \text{h} + \text{CO}_2\text{tot}$
RPI	$\text{Rib5p} \leftrightarrow \text{Rul5p}$
RPE	$\text{Rul5p} \leftrightarrow \text{Xul5p}$
TK(1)+TA	$\text{Rib5p} + \text{Xul5p} \leftrightarrow \text{Fru6P} + \text{E4P}$
TK(3)	$\text{E4P} + \text{Sed7P} \leftrightarrow \text{Fru6P} + \text{Rib5p}$
TA	$\text{GA3P} + \text{Sed7P} \leftrightarrow \text{Fru6P} + \text{E4P}$
TK(1)	$\text{Rib5p} + \text{Xul5p} \leftrightarrow \text{GA3P} + \text{Sed7P}$
G3PDH	$\text{DHAP} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{glyc3p} + \text{NAD}$
PYRCK	$\text{Pyr} + \text{ATP} + \text{CO}_2\text{tot} \leftrightarrow \text{OAA} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{h}_2\text{o}$
TPP	$(2) \text{Glc6P} + \text{utp} + \text{h}_2\text{o} > \text{Treh} + \text{ppi} + \text{udp} + \text{P}_i$
TreP	$\text{Treh} + \text{h}_2\text{o} > (2) \text{Glu}_{\text{int}}$
PDC	$\text{Pyr} > \text{ACALD} + \text{CO}_2\text{tot}$
DHAK	$\text{DHA} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{DHAP} + \text{ADP}$
PMI	$\text{Fru6P} \leftrightarrow \text{Man6p}$
CAT	$\text{Metoh} + (0.5) \text{O}_2 + (2) \text{NAD} > \text{CO}_2\text{tot} + (2) \text{NADH}$
MET	$\text{Metoh} + \text{Xul5p} + (0.5) \text{O}_2 > \text{DHA} + \text{GA3P}_{\text{per}}$

1.3 Reaccions i transicions atòmiques utilitzades per el càlculs de les distribucions de fluxos mitjançant INST¹³C-MFA, seguint la notació proposada en [46].

Abreviatura	Reacció
feedGlcB:	FullyGlu > Glu _{ext} #abcdef > #abcdef
feedGlcC:	CGlu > Glu _{ext} #abcdef > #abcdef
uptGlc:	Glu _{ext} > Glu _{int} #abcdef > #abcdef
feedMeOHB:	MetohL > Metoh _{ext} #a > #a
uptMeOH:	Metoh _{ext} > Metoh _{int} #a > #a
upt1:	Glu _{int} > Glc6P #abcdef > #abcdef
upt2:	Metoh _{int} > Form #a > #a
TRE1:	Glc6P > T6P #abcdef > #abcdef
TRE2:	T6P > Treh #abcdef > #abcdef
TRE3:	Treh > Glu _{int} #abcdef > #abcdef
emp1:	Glc6P <> Fru6P #abcdef > #abcdef
emp2:	Fru6P > FBP #abcdef > #abcdef
emp2B	FBP > Fru6P #abcdef > #abcdef
emp3:	FBP <> DHAP + GA3P #abcdef > #cba + #def
emp4:	DHAP <> GA3P #abc > #abc
emp5:	GA3P <> PG3 #abc > #abc
emp6:	PG3 <> PG2 #abc > #abc
emp7:	PG2 <> Pep #abc > # abc
emp8:	Pep > Pyr #abc > #abc
emp9:	Pyr > ACCoA _{cyt} + CO2 #abc > #bc + #a
emp10:	Pyr + CO2 > OAA _{mit} #abc + #d > #abcd

emp11:	Pyr > Pyrt #abc > #abc
emp11A:	Pyr > Pyr _{mit} #abc > #abc
emp11B:	Pyr _{mit} > Pyrt #abc > #abc
emp11C:	NPyr > Pyr _{mit} #ABC > #ABC
emp11D:	Pyr _{mit} > Pyr _{ext} #ABC > #ABC
emp12:	ACCoA _{cyt} > ACCoA _{mit} #AB > #AB
ppp1:	Glc6P > CO ₂ + Rul5P #abcdef > #a + #bcdef
ppp2:	Rul5P <> Xul5P #abcde > #abcde
ppp3:	Rul5P <> Rib5P #abcde > #abcde
ppp4:	Xul5P + E4P <> GA3P + Fru6P #ABCDE + #abcd > #CDE + #ABabcd
ppp5:	Xul5P + Rib5P <> Sed7P + GA3P #abcde + #ABCDE > #ABabcde + #CDE
ppp6:	GA3P + Sed7P <> E4P + Fru6P #ABC + #abcdefg > #defg + #abcABC
TCA1:	Pyr _{mit} > ACCoA _{mit} + CO ₂ #ABC > #BC + #A
TCA2:	ACCoA _{mit} + OAA > CIT _{mit} #AB + #abcd > #dcbaBA
TCA3:	CIT _{mit} > aKG + CO ₂ #ABCDEF > #ABCEF + #D
TCA4:	aKG > SUCC + CO ₂ #ABCDE > #BCDE + #A
TCA4B:	aKG > SUCC + CO ₂ #ABCDE > #EDCB + #A
TCA5:	SUCC <> FUM #ABCD > #ABCD
TCA5B:	SUCC <> FUM #ABCD > #DCBA
TCA6:	FUM <> MAL #ABCD > #ABCD
TCA7:	MAL <> OAA #ABCD > #ABCD
TCA8:	Asp > FUM #ABCD > #ABCD
Met1:	Form > CO ₂ #A > #A

Met2:	Xul5P + Form > DHA + GA3P _{per} #ABCDE + #F > #FAB + #CDE
Met2B:	Xul5P + Form > DHA + GA3P _{per} #ABCDE + #F > #ABF + #CDE
Met3:	DHA > DHAP #ABC > #ABC
Met4:	GA3P _{per} > GA3P #ABC > #ABC
BIO1:	Glc6P > Glc6P _{bio} #ABCDEF > #ABCDEF
BIO2:	Fru6P > Fru6P _{bio} #ABCDEF > #ABCDEF
BIO3:	ACCoA _{cyt} > ACCoA _{bio} #BC > #BC
BIO4:	OAA > OAA _{bio} #ABCD > #ABCD
BIO5:	E4P > E4P _{bio} #ABCD > #ABCD
BIO6:	Rib5P > Rib5P _{bio} #ABCDE > #ABCDE
BIO7:	GA3P > GA3P _{bio} #ABC > #ABC
BIO8:	αKG _{mit} > αKG _{bio} #ABCDE > #ABCDE
BIO9:	Pyrt > Pyr _{bio} #ABC > #ABC
CO2out1:	CO ₂ > CO _{2_ext} #A > #A
aa_ala:	Pyr <> Ala #ABC > #ABC
aa_glu:	αKG _{mit} <> Glu #ABCDE > #ABCDE
aa_asp:	OAA <> Asp #ABCD > #ABCD

sotopomers massícs mesurada durant l'experiment amb ^{13}C .

	0.001	0.003	0.006	0.008	0.011	0.014	0.017	0.019	0.022	0.028	0.033	0.042	0.056	0.083	0.167	0.500	1.000	2.000	4.000	6.000
0.957	0.954	0.954	0.957	0.953	0.939	0.938	0.945	0.942	0.940	0.926	0.914	0.878	0.871	0.755	0.542	0.393	0.308	0.259	0.254	
0.037	0.038	0.038	0.036	0.039	0.039	0.042	0.043	0.046	0.048	0.053	0.057	0.066	0.091	0.144	0.224	0.276	0.298	0.302	0.305	
0.005	0.007	0.006	0.007	0.008	0.020	0.020	0.011	0.011	0.011	0.018	0.023	0.042	0.023	0.057	0.129	0.187	0.223	0.244	0.244	
0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.005	0.011	0.013	0.035	0.075	0.107	0.127	0.142	0.146	
0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.003	0.002	0.010	0.030	0.037	0.044	0.052	0.052	
0.963	0.963	0.963	0.963	0.964	0.962	0.960	0.961	0.959	0.958	0.953	0.947	0.936	0.910	0.830	0.627	0.459	0.351	0.292	0.271	
0.039	0.039	0.040	0.040	0.038	0.040	0.041	0.042	0.042	0.043	0.046	0.051	0.059	0.073	0.114	0.200	0.261	0.293	0.305	0.304	
-0.001	-0.002	-0.002	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	0.001	0.003	0.006	0.015	0.044	0.118	0.183	0.222	0.245	0.256	
0.000	0.000	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.001	0.009	0.042	0.077	0.104	0.123	0.129	
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.012	0.021	0.030	0.036	0.040	
0.955	0.960	0.958	0.960	0.958	0.944	0.953	0.945	0.942	0.937	0.929	0.919	0.893	0.846	0.725	0.505	0.364	0.275	0.222	0.215	
0.044	0.039	0.042	0.041	0.042	0.046	0.045	0.049	0.054	0.057	0.062	0.070	0.082	0.104	0.157	0.240	0.288	0.311	0.320	0.317	
0.000	-0.002	-0.003	-0.003	-0.003	-0.002	-0.002	-0.001	0.000	0.001	0.003	0.004	0.011	0.028	0.065	0.140	0.192	0.231	0.248	0.252	
0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.011	0.005	0.005	0.003	0.004	0.005	0.007	0.010	0.019	0.042	0.083	0.114	0.133	0.154	0.158	
0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.011	0.033	0.041	0.050	0.056	0.058	
0.986	0.979	0.986	0.989	0.984	0.993	0.976	0.982	0.983	0.979	0.977	0.990	0.994	0.944	0.865	0.661	0.430	0.305	0.274	0.245	
0.006	0.009	0.008	0.001	0.005	0.006	0.015	0.005	0.003	0.004	0.010	0.007	0.012	0.050	0.098	0.175	0.247	0.276	0.264	0.280	
-0.009	-0.007	-0.010	-0.014	-0.008	-0.012	-0.007	-0.008	-0.009	-0.004	-0.006	-0.008	-0.007	0.000	0.032	0.099	0.186	0.210	0.231	0.237	
-0.003	-0.003	-0.002	-0.004	-0.003	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.006	-0.003	-0.003	-0.001	-0.003	0.004	0.032	0.083	0.120	0.146	0.150	
0.019	0.019	0.015	0.025	0.020	0.011	0.016	0.021	0.021	0.022	0.019	0.012	0.001	0.025	0.016	0.021	0.032	0.055	0.069	0.066	
0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.005	0.003	0.002	0.002	0.004	0.004	0.012	0.012	0.023	0.016	0.021	
0.952	0.926	0.860	0.812	0.738	0.709	0.671	0.626	0.615	0.573	0.524	0.513	0.495	0.457	0.412	0.408	0.421	0.437	0.452	0.428	
0.037	0.074	0.113	0.159	0.202	0.226	0.255	0.271	0.261	0.271	0.286	0.279	0.265	0.261	0.242	0.240	0.235	0.244	0.228	0.241	
0.006	-0.011	0.020	0.017	0.033	0.039	0.027	0.050	0.064	0.077	0.106	0.120	0.131	0.144	0.186	0.174	0.176	0.166	0.161	0.161	
0.005	0.011	0.007	0.011	0.027	0.027	0.048	0.053	0.060	0.080	0.084	0.089	0.110	0.138	0.160	0.177	0.168	0.153	0.159	0.170	

ta i anàlisi de fluxos metabòlics basades en experiments dinàmics de marcatge ¹³C

0.970	0.935	0.892	0.832	0.770	0.731	0.682	0.650	0.633	0.590	0.559	0.521	0.485	0.456	0.423	0.421	0.430	0.435	0.458	0.433
0.030	0.067	0.096	0.151	0.197	0.218	0.248	0.266	0.264	0.280	0.285	0.295	0.282	0.268	0.252	0.251	0.253	0.251	0.234	0.244
-0.001	-0.002	0.009	0.007	0.014	0.022	0.033	0.038	0.045	0.060	0.072	0.088	0.116	0.146	0.165	0.158	0.154	0.155	0.151	0.158
0.002	0.000	0.003	0.010	0.019	0.029	0.037	0.046	0.058	0.070	0.084	0.096	0.117	0.130	0.160	0.169	0.163	0.159	0.157	0.165
1.005	0.956	0.907	0.854	0.779	0.753	0.734	0.674	0.654	0.621	0.598	0.561	0.512	0.502	0.435	0.468	0.420	0.428	0.422	0.404
0.004	0.055	0.097	0.139	0.196	0.201	0.208	0.243	0.246	0.256	0.253	0.261	0.273	0.248	0.259	0.244	0.252	0.256	0.254	0.259
-0.011	-0.009	-0.008	0.001	0.011	0.018	0.027	0.040	0.048	0.060	0.072	0.087	0.110	0.128	0.164	0.150	0.173	0.167	0.173	0.176
0.002	-0.002	0.004	0.006	0.014	0.028	0.031	0.043	0.051	0.064	0.077	0.091	0.105	0.122	0.142	0.138	0.156	0.149	0.152	0.161
0.983	0.978	0.962	0.948	0.921	0.905	0.885	0.871	0.850	0.828	0.793	0.769	0.717	0.677	0.643	0.624	0.617	0.596	0.592	0.591
0.014	0.017	0.030	0.034	0.047	0.045	0.058	0.070	0.076	0.091	0.114	0.127	0.150	0.175	0.184	0.193	0.195	0.210	0.211	0.217
0.003	0.005	0.009	0.018	0.032	0.049	0.058	0.059	0.074	0.081	0.093	0.104	0.132	0.158	0.173	0.184	0.187	0.194	0.197	0.192
0.936	0.918	0.890	0.855	0.823	0.790	0.765	0.746	0.725	0.688	0.666	0.635	0.595	0.560	0.527	0.535	0.523	0.515	0.505	0.501
0.032	0.044	0.065	0.086	0.109	0.120	0.134	0.144	0.152	0.164	0.167	0.178	0.183	0.179	0.170	0.159	0.165	0.165	0.167	0.168
0.029	0.030	0.032	0.036	0.035	0.045	0.048	0.048	0.054	0.066	0.074	0.082	0.101	0.121	0.141	0.138	0.140	0.142	0.148	0.150
0.002	0.008	0.014	0.023	0.034	0.045	0.053	0.062	0.069	0.082	0.093	0.105	0.120	0.140	0.162	0.169	0.173	0.178	0.180	0.181
0.932	0.921	0.905	0.880	0.856	0.836	0.816	0.796	0.780	0.749	0.722	0.691	0.653	0.617	0.587	0.581	0.571	0.564	0.552	0.548
0.033	0.037	0.039	0.048	0.058	0.065	0.074	0.083	0.090	0.102	0.111	0.121	0.131	0.134	0.129	0.127	0.129	0.130	0.135	0.136
0.022	0.020	0.021	0.022	0.022	0.024	0.025	0.027	0.030	0.036	0.042	0.050	0.060	0.074	0.083	0.084	0.087	0.089	0.092	0.094
0.001	0.002	0.002	0.004	0.005	0.007	0.009	0.012	0.014	0.019	0.025	0.032	0.042	0.055	0.069	0.071	0.075	0.078	0.081	0.083
0.011	0.021	0.033	0.046	0.059	0.068	0.076	0.082	0.086	0.094	0.100	0.105	0.113	0.120	0.132	0.137	0.138	0.139	0.139	0.139
0.944	0.939	0.933	0.921	0.901	0.875	0.848	0.822	0.798	0.744	0.695	0.644	0.574	0.502	0.443	0.447	0.435	0.432	0.422	0.416
0.035	0.039	0.044	0.055	0.066	0.086	0.102	0.115	0.126	0.153	0.172	0.190	0.207	0.218	0.209	0.203	0.205	0.203	0.206	0.209
0.017	0.018	0.019	0.019	0.023	0.023	0.027	0.032	0.037	0.047	0.059	0.071	0.092	0.115	0.137	0.131	0.135	0.137	0.140	0.142
0.001	0.001	0.000	0.002	0.003	0.006	0.009	0.012	0.017	0.026	0.036	0.048	0.068	0.093	0.120	0.121	0.126	0.128	0.131	0.132
0.002	0.003	0.004	0.004	0.008	0.010	0.015	0.018	0.022	0.031	0.038	0.046	0.059	0.072	0.091	0.098	0.098	0.100	0.101	0.101
0.942	0.942	0.942	0.942	0.943	0.941	0.942	0.942	0.942	0.941	0.939	0.940	0.934	0.935	0.910	0.840	0.811	0.675	0.462	0.318
0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.058	0.057	0.057	0.057	0.057	0.058	0.058	0.059	0.061	0.067	0.088	0.133	0.210	0.330	0.410
0.000	-0.001	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.007	0.017	0.035	0.065	0.085
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.005	0.011	0.022	0.040	0.053

Capítol 5

0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.004	0.008	0.017	0.030	0.040
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.003	0.007	0.013	0.018
0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.000	0.005	0.001	0.016	0.052	0.016	0.034	0.060	0.076
0.940	0.909	0.876	0.819	0.774	0.735	0.697	0.658	0.650	0.596	0.578	0.550	0.511	0.500	0.452	0.459	0.447	0.434	0.442	0.446
0.042	0.059	0.107	0.139	0.167	0.191	0.207	0.218	0.214	0.241	0.242	0.243	0.244	0.221	0.219	0.203	0.210	0.209	0.216	0.197
0.019	0.027	0.012	0.033	0.053	0.044	0.050	0.068	0.077	0.095	0.092	0.112	0.135	0.159	0.170	0.167	0.181	0.178	0.181	0.192
-0.001	0.006	0.005	0.008	0.006	0.031	0.046	0.056	0.060	0.068	0.087	0.095	0.111	0.120	0.159	0.171	0.161	0.179	0.161	0.165
0.983	0.982	0.972	0.966	0.958	0.946	0.931	0.906	0.904	0.895	0.883	0.886	0.878	0.859	0.823	0.800	0.801	0.801	0.785	0.781
0.006	0.024	0.032	0.040	0.045	0.059	0.065	0.078	0.077	0.079	0.082	0.080	0.079	0.086	0.091	0.088	0.084	0.099	0.102	0.103
0.000	-0.007	-0.004	-0.005	-0.002	-0.008	-0.003	0.008	0.010	0.014	0.021	0.017	0.022	0.029	0.041	0.042	0.042	0.053	0.057	0.053
0.011	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	0.004	0.006	0.008	0.009	0.012	0.015	0.017	0.021	0.026	0.037	0.042	0.037	0.047	0.056	0.073
0.976	0.973	0.969	0.962	0.954	0.942	0.927	0.912	0.901	0.868	0.835	0.796	0.727	0.644	0.493	0.470	0.452	0.456	0.450	0.444
0.026	0.029	0.032	0.039	0.046	0.055	0.067	0.077	0.085	0.106	0.126	0.147	0.179	0.209	0.240	0.237	0.245	0.244	0.244	0.254
-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	0.000	0.001	0.002	0.004	0.006	0.012	0.018	0.028	0.046	0.073	0.136	0.145	0.156	0.155	0.160	0.169
0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.004	0.006	0.008	0.014	0.021	0.030	0.049	0.074	0.131	0.147	0.147	0.145	0.146	0.153
0.958	0.953	0.953	0.953	0.953	0.951	0.951	0.947	0.948	0.942	0.937	0.930	0.912	0.886	0.793	0.566	0.377	0.238	0.174	0.156
0.044	0.049	0.047	0.049	0.048	0.049	0.051	0.053	0.053	0.056	0.061	0.064	0.075	0.090	0.131	0.201	0.249	0.269	0.267	0.267
-0.004	-0.002	0.000	-0.002	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	0.002	0.001	0.005	0.011	0.021	0.056	0.139	0.210	0.257	0.278	0.284
0.001	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.002	0.013	0.061	0.113	0.159	0.186	0.195
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.004	0.022	0.042	0.061	0.077	0.078
0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.004	0.011	0.010	0.016	0.020
0.968	0.964	0.964	0.963	0.961	0.957	0.954	0.949	0.946	0.936	0.926	0.910	0.878	0.821	0.662	0.440	0.326	0.256	0.221	0.209
0.034	0.037	0.037	0.039	0.041	0.044	0.046	0.049	0.051	0.058	0.065	0.074	0.091	0.119	0.182	0.258	0.293	0.311	0.315	0.315
-0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.004	0.008	0.017	0.032	0.086	0.166	0.210	0.238	0.253	0.258
-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.003	0.004	0.007	0.013	0.023	0.056	0.100	0.125	0.143	0.154	0.160
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.004	0.015	0.036	0.046	0.052	0.057	0.059

Apèndix 3

3.1. Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars en estat estacionari sota les condicions experimentals.

Taula 3.1 Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars d'aminoàcids

Aminoàcid	Extracel·lular		Intracel·lular	
	mmol/L		mmol/g _{CDW}	
	valor	sd	valor	sd
Ala	1.19	0.22	14.29	0.40
Gly	0.44	0.33	1.20	1.04
Val	n.d.	n.d.	1.24	0.04
Leu	0.06	0.03	0.63	0.02
Ile	0.04	0.02	0.28	0.02
Pro	0.03	0.03	2.57	0.04
Ser	n.d.	n.d.	5.50	0.05
Thr	0.04	0.02	2.44	0.08
Asp	0.08	0.00	38.68	0.53
Phe	0.02	0.01	0.17	0.02
Orn	1.53	1.08	21.23	1.81
Glu	n.d.	n.d.	84.31	2.58
Lys	0.27	0.18	6.83	0.06
Asn	0.11	0.07	4.20	0.09
Gln	0.01	0.06	83.27	2.40
Tyr	0.03	0.02	0.18	0.02
His	0.01	0.02	4.15	0.09
Trp	n.d.	n.d.	0.08	0.01
Met	n.d.	n.d.	0.44	0.04

Taula 3.2 Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars de metabòlits del sistema central.

Metabòlit	Extracel·lular		Intracel·lular	
	mmol/L		mmol/g _{CDW}	
	valor	sd	valor	sd
FUM	0.36	0.02	0.67	0.03
SUCC	0.27	0.04	1.79	0.09
MAL	0.09	0.11	2.49	2.16
αKG	0.47	0.03	1.27	0.08
Pep	0.03	0.05	0.66	0.02
Glu	35.77	3.99	0.78	0.86
GA3P	n.d.	n.d.	0.001	0.0001
Citrate	n.d.	n.d.	7.03	0.20
PG2	0.05	0.01	0.20	0.02
IsoCitrate	n.d.	n.d.	0.05	0.00
DHAP	n.d.	n.d.	0.71	0.02
PG3	0.06	0.00	1.78	0.06
E4P	0.38	0.01	0.08	0.00
Rib5P	0.08	0.01	0.88	0.07
Rul5P	n.d.	n.d.	0.23	0.03
Xul5P	n.d.	n.d.	0.16	0.02
Man6P	0.14	0.04	1.16	0.03
Fru6P	0.17	0.02	3.19	0.13
Glc6P	0.52	0.05	14.31	0.43
Sed7P	0.27	0.02	5.41	0.17
FBP	0.21	0.13	0.93	0.05
T6P	0.12	0.00	0.11	0.01
Treh	1.69	0.06	24.50	0.71
Pyr	43.19	4.99	1.62	0.18

Apèndix 4.

4.1 Resultats de la distribució de fluxos després de l'anàlisi INST¹³C-MFA. Tots els valors estan en mmol/g_{DCW}·h⁻¹

<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>	<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>
aa_ala_bwd	0.511	0.044	feedGlcB_fwd	0.141	0.001
aa_ala_fwd	0.511	0.044	feedGlcC_fwd	0.564	0.006
aa_asp_bwd	27.326	11.017	feedMeOHB_fwd	0.938	0.019
aa_asp_fwd	27.768	11.000	Met1_fwd	0.504	0.071
aa_glu_bwd	41.163	25.000	Met2_fwd	0.217	0.034
aa_glu_fwd	41.163	25.000	Met2B_fwd	0.217	0.034
bio1_fwd	0.110	0.005	Met3_fwd	0.434	0.068
bio2_fwd	0.052	0.002	Met4_fwd	0.434	0.068
bio3_fwd	0.070	0.034	ppp1_fwd	0.550	0.098

bio4_fwd	0.093	0.003	ppp2_bwd	0.217	0.061
bio5_fwd	0.028	0.001	ppp2_fwd	0.696	0.033
bio6_fwd	0.033	0.002	ppp3_bwd	0.000	0.064
bio7_fwd	0.008	0.000	ppp3_fwd	0.070	0.038
bio8_fwd	0.121	0.002	ppp4_bwd	1.665	0.168
bio9_fwd	0.295	0.008	ppp4_fwd	1.674	0.160
CO2out1_fwd	1.904	0.104	ppp5_bwd	0.077	0.140
emp1_bwd	1.102	0.066	ppp5_fwd	0.114	0.130
emp1_fwd	1.148	0.072	ppp6_bwd	1.264	0.077
emp10_wd	0.214	0.004	ppp6_fwd	1.301	0.057
emp11_fwd	0.001	0.012	Tca1_fwd	0.247	0.055
emp11A_fwd	0.541	0.056	Tca2_fwd	0.372	0.069
emp11B_fwd	0.293	0.015	Tca3_fwd	0.372	0.069
emp11C_fwd	1.087	0.072	Tca4_fwd	0.125	0.035
emp11D_fwd	1.087	0.072	Tca4B_fwd	0.125	0.035
emp12_fwd	0.124	0.044	Tca5_bwd	0.188	0.066
emp2_fwd	0.186	0.020	Tca5_fwd	0.313	0.056
emp2B_fwd	0.145	0.024	Tca5B_fwd	0.313	0.056
emp3_bwd	1.650	0.621	Tca5B_bwd	0.188	0.066
emp3_fwd	1.691	0.620	Tca6_bwd	0.993	1.352
emp4_bwd	96.980	150.000	Tca6_fwd	1.257	1.200
emp4_fwd	97.454	150.000	Tca7_bwd	6.018	7.028
emp5_bwd	3.750	4.900	Tca7_fwd	6.282	7.010
emp5_fwd	4.700	4.900	Tca8_fwd	0.013	0.021
emp6_bwd	0.995	3.300	TRE1_fwd	0.010	0.016
emp6_fwd	1.945	3.300	TRE2_fwd	0.010	0.016
emp7_bwd	0.005	0.096	TRE3_fwd	0.010	0.016
emp7_fwd	0.955	0.079	upt1	0.716	0.001
emp8_fwd	0.950	0.054	upt2	0.938	0.019
emp9_fwd	0.194	0.009	uptGlc	0.705	0.006

Bibliografia

1. Szyperski T: **Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1995, **232**:433–448.
2. Marx A, Graaf AA De, Wiechert W, Eggeling L: **Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear Magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing.** *Biotechnology and Bioengineering* 1996, **49**:111–129.
3. Schmidt K, Nørregaard LC, Pedersen B, Meissner a, Duus JO, Nielsen JO, Villadsen J: **Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and ¹³C-¹³C coupling constraints on the isotopomer distribution in labeled biomass components.** *Metabolic engineering* 1999, **1**:166–79.
4. Fischer E, Sauer U: **Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS.** *European Journal of Biochemistry* 2003, **270**:880–891.
5. Wiechert W, Wurzel M: **Metabolic isotopomer labeling systems Part I : global dynamic behavior.** *Mathematical Biosciences* 2001, **169**:173–205.
6. Sauer U: **Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis.** *Molecular Systems Biology* 2006, **2**:62.
7. Carnicer M, Canelas AB, Pierick A, Zeng Z, Dam J, Albiol J, Ferrer P, Heijnen JJ, Gulik W: **Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*.** *Metabolomics* 2011, **8**:284–298.
8. Nasution U, Van Gulik WM, Kleijn RJ, Winden WA Van: **Measurement of Intracellular Metabolites of Primary Metabolism and Adenine Nucleotides in Chemostat Cultivated *Penicillium chrysogenum*.** *InterScience* 2006, **94**:166.
9. Carnicer M, Baumann K, Töplitz I, Sánchez-Ferrando F, Mattanovich D, Ferrer P, Albiol J: **Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:65.
10. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D: **Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins.** *Biotechnology and Bioengineering* 2008, **100**:177–83.
11. Nöh K, Wiechert W: **Experimental Design Principles for Isotopically Instationary C Labeling Experiments.** *Biotechnology and Bioengineering* 2006, **94**:234–251.
12. Lange HC, Eman MR, Van Zuijlen G, Visser D, Van Dam JC, Frank J, De Mattos MJ, Heijnen JJ: **Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **75**:406–415.
13. Mashego MR, Wu L, Van Dam JC, Ras C, Vinke JL, Van Winden WA, Van Gulik WM, Heijnen JJ: **MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-¹³C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **85**:620–628.
14. Wu L, Mashego MR, Dam JC Van, Proell AM, Vinke JL, Ras C, Winden WA Van, Gulik WM Van, Heijnen JJ: **Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass**

spectrometry using uniformly ^{13}C -labeled cell extracts as internal standards. *Analytical biochemistry* 2005, **336**:164–171.

15. Douma RD, De Jonge LP, Jonker CTH, Seifar RM, Heijnen JJ, Van Gulik WM: **Intracellular metabolite determination in the presence of extracellular abundance: Application to the penicillin biosynthesis pathway in *Penicillium chrysogenum*.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **107**:105–15.

16. Canelas AB, Ras C, Pierick A, Dam JC Van, Heijnen JJ, Gulik WM Van: **Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics.** *Metabolomics* 2008, **4**:226–239.

17. Wahl SA, Dauner M, Wiechert W: **New Tools for Mass Isotopomer Data Evaluation in ^{13}C Flux Analysis: Mass Isotope Correction, Data Consistency Checking, and Precursor Relationships.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **3**:259–268.

18. Canelas AB, Ras C, Ten Pierick A, Van Gulik WM, Heijnen JJ: **An in vivo data-driven framework for classification and quantification of enzyme kinetics and determination of apparent thermodynamic data.** *Metabolic Engineering* 2011, **13**:294–306.

19. Zamboni N, Kümmel A, Heinemann M: **anNET: a tool for network-embedded thermodynamic analysis of quantitative metabolome data.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:199.

20. Orij R, Brul S, Smits GJ: **Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, **1810**:933–944.

21. Kümmel A, Panke S, Heinemann M: **Systematic assignment of thermodynamic constraints in metabolic network models.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:512.

22. Wang NS, Stephanopoulos G: **Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors.** *Biotechnology and Bioengineering* 1983, **25**:2177–2208.

23. Heijden V Der, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KC: **Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I. Classification of the Calculability and the Balanceability of Conversion Rates.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**:3–10.

24. Verheijen PJT: **Data Reconciliation and Error Detection.** In *The Metabolic Pathway Engineering Handbook*. edited by Smoke C CRC Press; 2010, **8**:8.1–8.13.

25. Canales M, Buxadó JA., Heynngnezz L, Enriquez A: **Mechanical disruption of *Pichia pastoris* yeast to recover the recombinant glycoprotein Bm86.** *Enzyme and Microbial Technology* 1998, **23**:58–63.

26. Wisselink HW, Cipollina C, Oud B, Crimi B, Heijnen JJ, Pronk JT, Van Maris AJA: **Metabolome, transcriptome and metabolic flux analysis of arabinose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metabolic Engineering* 2010, **12**:537–551.

27. Klimacek M, Krahulec S, Sauer U, Nidetzky B: **Limitations in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, made evident through comprehensive metabolite profiling and thermodynamic analysis.** *Applied and Environmental Microbiology* 2010, **76**:7566–7574.

28. Carnicer M: **Systematic metabòlic analysis of recombinant *Pichia pastoris* under diferent oxygen conditions.** 2012.

29. Canelas AB, Ten Pierick A, Ras C, Seifar RM, Van Dam JC, Van Gulik WM, Heijnen JJ: **Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics.** *Analytical Chemistry* 2009, **81**:7379–7389.
30. Aboka FO, Heijnen JJ, Van Winden W a: **Dynamic ¹³C-tracer study of storage carbohydrate pools in aerobic glucose-limited *Saccharomyces cerevisiae* confirms a rapid steady-state turnover and fast mobilization during a modest stepup in the glucose uptake rate.** *FEMS Yeast Research* 2009, **9**:191–201.
31. Zhao Z, Pierick A ten, Jonge L de, Heijnen JJ, Wahl A: **Substrate cycles in *Penicillium chrysogenum* quantified by isotopic non--stationary flux analysis.** *Microbial Cell Factories* 2012.
32. Bakker BM, Overkamp KM, AJ van M, Kötter P, Luttik MA, JP van D, Pronk JT: **Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2001, **25**:15–37.
33. Strijbis K, Van Roermund CWT, Hardy GP, Van den Burg J, Bloem K, De Haan J, Van Vlies N, Wanders RJA, Vaz FM, Distel B: **Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, **23**:2349–2359.
34. Mattanovich D, Graf AB, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F, Gasser B: **Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:29.
35. Schutter K De, Lin Y, Tiels P, Hecke A Van, Glinka S, Peer Y Van De, Callewaert N, Weberlehmann J, Rouze P: **Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*.** *Nature Biotechnology* 2009, **27**:561–566.
36. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P: **A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**:141.
37. Grotkjaer T, Akesson M, Christensen B, Gombert AK, Nielsen J: **Impact of transamination reactions and protein turnover on labeling dynamics in (¹³)C-labeling experiments.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **86**:209–216.
38. Jones JG, Bellion E: **Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*.** *Biochemical Journal* 1991, **280**:475–481.
39. Hartner FS, Glieder A: **Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts.** *Microbial Cell Factories* 2006, **5**:39.
40. Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Szyperski T, Ferrer P: **Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol / methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates.** *Microbiology* 2007:433–448.
41. Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U: **Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:545–558.
42. González-Siso MI, García-Leiro A, Tarrío N, Cerdán ME: **Sugar metabolism, redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**:46.

-
43. Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H: **Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**:60.
44. Caspeta L, Shoaie S, Agren R, Nookaew I, Nielsen J: **Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in-silico evaluation of their potentials.** *BMC Systems Biology* 2012, **6**:24.
45. Chung BKS, Selvarasu S, Camattari A, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee H, Lee D: **Genome-scale metabolic reconstruction an in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement.** *Microbial Cell Factories* 2010:50–65.
46. Wiechert W, De Graaf a a: **Bidirectional reaction steps in metabolic networks: I. Modeling and simulation of carbon isotope labeling experiments.** *Biotechnology and Bioengineering* 1997, **55**:101–117.

Introducció

Tal i com ja s'ha esmentat en capítols anteriors, l'expressió d'un gen forà (o recombinant) pot resultar en una alteració del comportament metabòlic cel·lular com a conseqüència de la necessitat de redistribuir els precursors biosintètics i recursos energètics per tal de satisfer els requeriments addicionals derivats de la síntesis del producte desitjat. D'altra banda, el creixement sota condicions de co-utilització de substrats mixtes, sembla que permet alleugerir la càrrega metabòlica associada a l'estrès per la producció de proteïna recombinant. Donada la complexitat d'aquestes respostes i adaptacions metabòliques, és necessari combinar tota la informació possible (particularment, dades de metabolòmica i fluxòmica) per tal d'obtenir un millor coneixement del comportament del metabolisme d'aquest llevat metilotròfic. En aquest treball hem combinat una anàlisi metabolòmica conjuntament amb una anàlisi de fluxos metabòlics instacionari (és a dir, en condicions de marcatge de ^{13}C dinàmiques) per tal d'avaluar l'impacte de la producció de proteïna recombinant en el metabolisme central de carboni en cèl·lules creixement en condicions de co-assimilació de glucosa i metanol. S'ha utilitzat la mateixa metodologia d'anàlisi metabolòmica basada en GC-MS i LC-MS descrita en el capítol anterior.

Els resultats ens indiquen variacions significatives en els diferents conjunts (*pools*) de metabòlits intracel·lulars i d'aminoàcids entre les dues soques comparades (X-33 control i X-33 Rol_1), mostrant un augment global d'aquests *pools* a la soca productora. A més a més, aquesta anàlisi comparativa s'ha estès a una tercera soca amb una capacitat de producció de proteïna superior, observant diferències tant en el perfil d'aquests pools de metabòlits com en la distribució de fluxos a través del metabolisme central de carboni. Concretament, una de les diferències més acusada fou la concentració intracel·lular de trehalosa, la qual està estretament relacionada amb els nivells d'estrès cel·lular, i la concentració de Xul5P, indicador de la quantitat de metanol que està sent assimilat per la cèl·lula. D'altra banda, la distribució de fluxos metabòlics obtinguda per la soca control i la soca Rol_1 durant el transcurs d'aquest treball ha resultat de ser comparable amb els resultats presentats en el capítol 3 on s'utilitzà una metodologia d'anàlisi de fluxos basada en dades de marcatge d'aminoàcids proteinogènics.

Materials i mètodes

Soques i condicions de cultiu

En aquest estudi comparatiu s'han utilitzat diferents soques recombinants derivades de la soca *P. pastoris* X-33 (Invitrogen). Concretament, la soca control utilitzada en els diferents treballs d'aquesta tesi, la soca X-33/Rol_1[1], la qual conté una sola còpia del gen *ROL*. També s'ha utilitzat una tercera soca, derivada de la GS115H[2] (és a dir,

isogènica a X-33 [3],[4],[5]) però que conté més d'una copia del gen *ROL*. Seguint la metodologia ja descrita en capítols anteriors, es realitzaren cultius operats en continu per a cada soca i per duplicat en un bioreactor de 2L (Applikon, The Netherlands). El medi de cultiu utilitzat fou el mateix descrit en el capítol anterior, utilitzant una relació de font de carboni glucosa/metanol de 4:1. Els cultius es dugueren a terme a una taxa de dilució fixada de 0.09h^{-1} , assolint en tots els casos condicions carboni limitants, amb tots els paràmetres de cultiu (sobrepessió del reactor, pH, velocitat d'agitació, cabal d'aeració i temperatura) foren idèntiques a les utilitzades en els estudis descrits en el capítol anterior.

Disseny experimental i anàlisi de fluxos metabòlics.

Tan el disseny experimental com l'anàlisi de resultats després del marcatge ^{13}C , foren els ja descrits durant els capítols anteriors. Breument, per la mesura de concentracions intracel·lulars d'aminoàcids i metabòlits foren avaluades entre una o dues hores prèvies al canvi de medi ^{13}C utilitzant la metodologia de mostreig ràpid (*rapid sampling*) [6]. Tant el protocol de presa de mostra [7],[8], com el tractament de dades es realitzaren de la forma descrita en la literatura [9].

La xarxa metabòlica utilitzada en aquest estudi fou la plantejada per el capítol anterior i la distribució de flux de carboni obtinguda per aquesta ret en concret fou definit com el millor ajust dels isotopomers màssics simulats als diferents valors obtinguts per les mesures de fluxos extracel·lular i els isotopomer màssics prèviament mesurats ponderat per la seva variança experimental. Tenint en compte experiments previs, una variança experimental del 2 % fou assumida per totes les distribucions dels diferents isotopomers màssics. En aquest estudi, s'utilitzà el concepte d'aproximació instacionari proposat per Wiechert [10] per a la realització de les diferents simulacions d'enriquiment ^{13}C . La solució al sistema ordinari d'equacions diferencials i l'optimització dels diferents paràmetres del sistema s'implementà en el programa de càlcul gPROMS 3.1 (PSE Limited, London), tal i com s'explica en el capítol 5 materials i mètodes. Per la totalitat de resultats presentats en aquest treball el flux obtingut per un ajust acceptable fou aquell on el mínim residual ponderat fou inferior al χ^2 obtingut per cada cas amb un nivell de confiança del 95% corresponent al grau de llibertat de la xarxa plantejada.

Procediment analític

Tots el procediments analítics (anàlisi de biomassa i quantificació de metabòlits extracel·lulars) es realitzà seguint la metodologia descrita en el capítol anterior i a la bibliografia [11]. La composició macromolecular i elemental de la biomassa utilitzada en els diferents càlculs i restriccions metabòliques fou la mateixa descrita en el capítol 2 d'aquest treball per les diferents soques utilitzades. Per tots els diferents cultius realitzats la recuperació de carboni fou aproximadament del 98% anterior al pas de reconciliació estadística. Els valors experimentals foren verificats amb la utilització de

diferents passos de reconciliació i consistència estadística [12][13][14] sota restriccions de conservació de relacions elementals. Així doncs, per tots els experiments en continu s'aplicà un test de consistència estadística amb un nivell de confiança del 95% , mostrant la no existència d'errors en les diferents mesures realitzades.

La consistència de les mesures de concentracions intracel·lulars fou verificada mitjançant una metodologia basada en la segona llei de la termodinàmica, una reacció biològica solament pot ocórrer en la direcció d'un canvi negatiu en l'energia de Gibbs. [15]. Els diferents càlculs realitzats per realitzar aquesta comprovació foren efectuats utilitzant el programa anNET desenvolupat per el Zamboni i col·laboradors [16] de la forma descrita en el capítol anterior (Apèndix 7 i 8). Els rangs factibles dels metabòlits intracel·lulars quantificats foren calculats utilitzant la mitjana respectiva de cada valor amb la seva desviació estàndard. Els límits superiors així com els diferents límits inferiors possibles foren determinats d'acord amb una distribució "T-Student" de dues coes amb un interval de confiança del 85%.

Resultats

Cultius en continu

Els cultius operats en continu de *P. pastoris* es realitzaren en condicions aeròbiques i condicions carboni-limitants a una taxa de dilució de 0.09 h^{-1} , utilitzant una barreja de glucosa/metanol (80/20, p/p) com a font de carboni. Els resultats obtinguts foren comparables als mostrats en el capítol 3, amb l'excepció que en l'estudi present els cultius es realitzaren a una densitat cel·lular menor (4g/L). Així, d'acord amb els resultats previs, la producció de biomassa i la formació de diòxid de carboni foren els únics productes detectats sota aquestes condicions de cultiu. Un cop assolit un estat estacionari (reflectit en unes dades macroscòpiques constants en el temps), es varen estimar les diferents velocitats de consum de glucosa, metanol i oxigen així com la velocitat de producció de biomassa i diòxid de carboni (Taula 1). La consistència de les dades experimentals es verificà utilitzant procediments de reconciliació estàndard, amb la premissa de satisfer les diferents relacions de conservació elementals[14].

Taula 1. Consums i producció específics de *P. pastoris* sota condicions de creixement de glucosa:metanol en cultius en continu a una $D=0.09\text{h}^{-1}$. RQ, quocient respiratori. L'índex de consistència h fou inferior a 5 amb una redundància de 3 (95% nivell de significança).

	Glucosa (mmol/g _{DCW} .h)	Metanol (mmol/g _{DCW} .h)	OUR (mmol/g _{DCW} .h)	CER (mmol/g _{DCW} .h)	Biomassa (mmol/g _{DCW} .h)	RQ	Activitat Lipasa (UA/g _{DCW})
X-33 control	-0.71 ± 0.01	-0.94 ± 0.02	-2.57 ± 0.03	2.03 ± 0.03	3.14 ± 0.04	0.79 ± 0.04	0
Rol_1	-0.74 ± 0.01	-1.05 ± 0.02	-2.98 ± 0.04	2.39 ± 0.04	3.09 ± 0.05	0.81 ± 0.06	2417.1 ± 0.4
Rol_3	-0.74 ± 0.01	-1.09 ± 0.01	-2.93 ± 0.09	2.36 ± 0.09	3.15 ± 0.01	0.805 ± 0.12	8302.6 ± 185.3

Anàlisi comparativa de X-33 Rol_1 amb la soca de referència (X-33 control)

Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars dels pools de metabòlits.

Quan comparem els les concentracions de metabòlits intracel·lulars entre les diferents soques, no s'observen diferències en els perfils de la majoria de metabòlits quantificats (Figura 1). Tot i així, els valors absoluts dels *pools* foren generalment més elevats a la soca expressiva (Ro_1) en relació a la soca control. D'altra banda, aquesta diferència solament fou estadísticament observable en determinats metabòlits. Concretament, tots els metabòlits de la via de les PPP foren més elevats en la soca productora, amb excepció de l'E4P. Cal destacar que la mida del *pool* de Xul5P fou quasi el doble en la soca productora. Aquesta observació pot estar relacionada amb la fracció de metanol que està sent directament desassimilada cap a CO₂ (Figura 9, capítol 5, pàg. 150) (és a dir, no és assimilada al metabolisme central).

Un altre *pool* clarament diferenciat entre les dues soques és el de la trehalosa, carbohidrat de reserva, el qual és 2 cops més elevat en la soca productora (Rol_1) en relació a la soca control. És àmpliament conegut que alguns llevats (*S. cerevisiae*) incrementen el seu contingut de trehalosa en condicions d'estres ambiental [17],[18]. Així doncs, podem especular que l'augment en la concentració de trehalosa observat podria ser una resposta a l'adaptació de la cèl·lula a la resposta d'estrés a proteïnes mal plegades (*unfolded protein response*, UPR) ocasionat per la secreció de la proteïna model (ROL), [19]. A més a més, aquesta acumulació de trehalosa podria ser el resultat d'un increment en el consum d'ATP via un cicle fútil de reciclatge de carbohidrats de reserva [17], contribuint així a la demanda energètica relacionada amb la secreció de proteïna recombinant (Capítol_5).

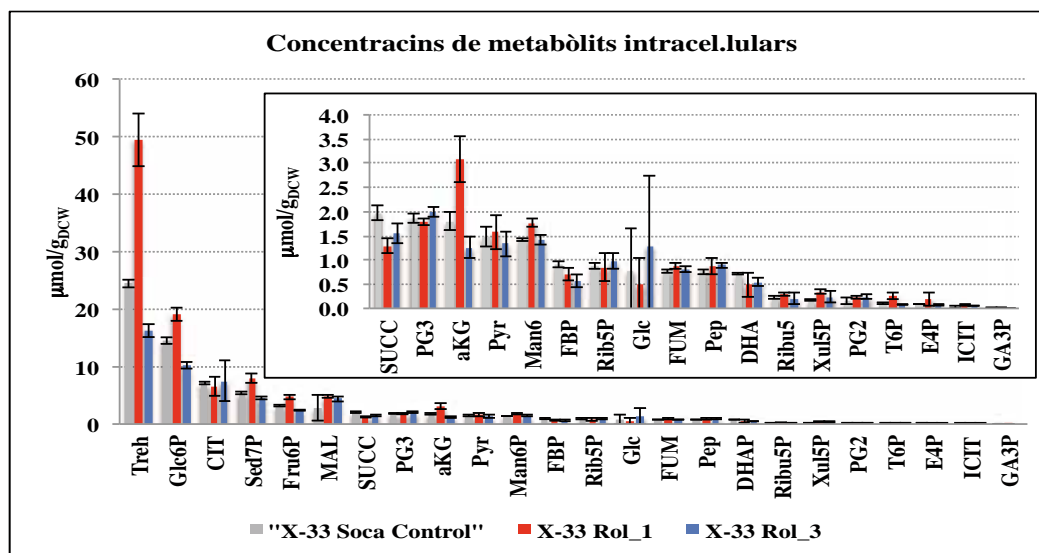


Figura 1. Concentracions intracel·lulars de metabòlits en *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb substrat mixt glucosa/metanol. Les concentracions s'expressen en µmol/g_{DCW}.

A més d'avaluar les concentracions intracel·lulars, també s'analitzaren i compararen els exometabolomes, és a dir, el perfil de concentracions de metabòlits al brou de cultiu (Figura 2) no observant diferències estadísticament significatives per cap dels metabòlits mesurats. No obstant, en aquesta figura es pot observar que la tendència de la

totalitat de mesures extracel·lulars dels diferents metabòlits són més baixos en la soca control que en la soca productora i que la majoria de metabòlits presents al brou de cultiu són intermediaris del cicle dels TCA i metabòlicament relacionats al PG3. Cal destacar que els valors mesurats per la Glc i el Pyr [20] foren molt més elevats comparats amb la resta de metabòlits presents en el brou de cultiu.

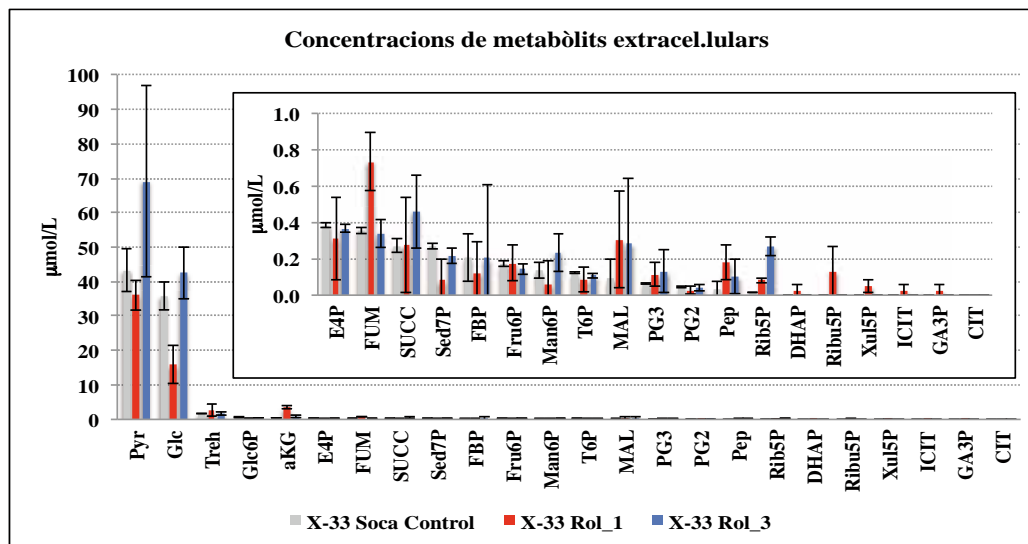


Figura 2. Concentracions extracel·lulars de metabòlits en *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb substrat mixt glucosa/metanol. Les concentracions s'expressen en µmol/L.

Concentracions intracel·lulars d'aminoàcids.

El perfil de concentracions intracel·lulars observat en *P. pastoris* creixement amb una barreja glucosa/metanol, segueix el mateix patró observat en estudis previs amb glucosa com a única font de carboni [11], obtenint valors generalment inferiors sota la condició de co-assimilació de glucosa/metanol. Per tant, aquesta tendència general és coherent amb l'observada pels altres metabòlits del metabolisme central. Tot i que, el perfil de concentracions d'aminoàcids intracel·lulars en la soca productora foren generalment superiors que en la soca control, només les de Asp, Orn, Ser, Asn, His, Thr, Pro, Val, Leu, Tyr i Phe foren significativament diferents, tot i que la demanda proteica per a la síntesis de biomassa fou similar per totes dues soques (Figura 3). D'altra banda, aquest comportament també ha estat observat en cultius aeròbics d'una soca de *P. pastoris* productora d'un fragment d'anticòs (Fab) creixent amb glucosa com única font de carboni [11].

Per tal de tenir una visió més general de les variacions dels perfils dels diferents aminoàcids, es sumaren les concentracions d'aquests metabòlits procedents d'un mateix precursor metabòlic (valors no mostrats). Interessantment, totes les diferents famílies d'aminoàcids és situaven sobre un valor global molt similar no mostrant una diferència clara com a conseqüència de la síntesis de proteïna tot i que el contingut total d'aminoàcid en *P. pastoris* fou inferior per la soca control (288.32 µmol/g_{DCW}) comparat amb (324.58 µmol/g_{DCW}) per la soca expressiva.

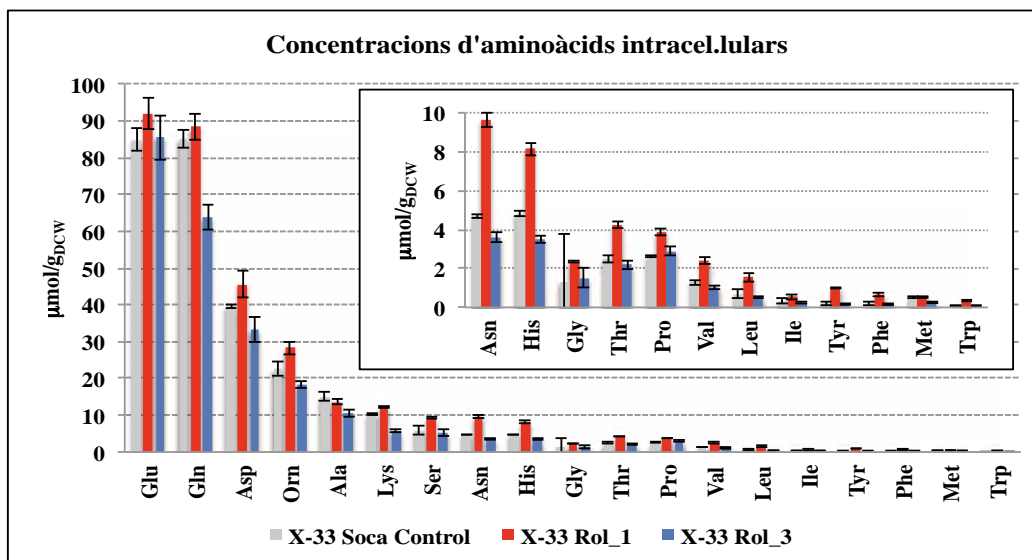


Figura 3. Concentracions intracel·lulars d'aminoàcids en *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb substrat mixt glucosa/metanol. Les concentracions s'expressen en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$.

Concentracions extracel·lulars d'aminoàcids.

L'anàlisi comparativa de l'exometaboloma entre les dues soques també s'ha estès als aminoàcids. Així, seguint la mateixa tendència observada pels metabòlits centrals, la concentració total d'aminoàcids extracel·lulars (Figura 4) fou inferior en la soca control (3.86 $\mu\text{mol/L}$) en relació als valors mesurats en cultius de la soca productora (9.18 $\mu\text{mol/L}$). Tanmateix, en el moment de realitzar una comparació per a cadascun dels aminoàcids individualment, no s'observaren diferències estadísticament significatives entre les dues soques.

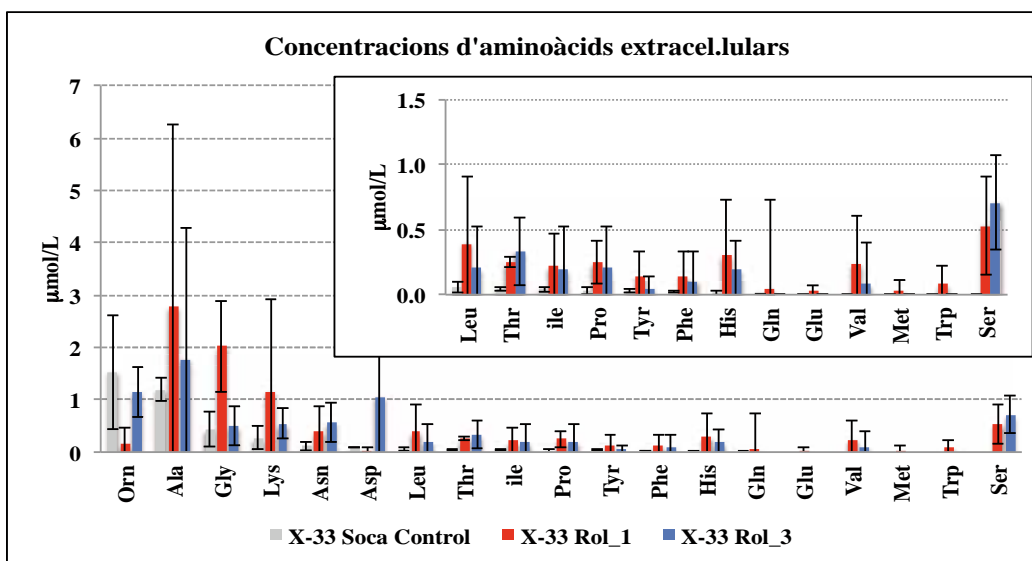


Figura 4. Concentracions extracel·lulars d'aminoàcids en *P. pastoris* X-33 sota condicions de creixement amb substrats mixtes glucosa/metanol. Les concentracions s'expressen en $\mu\text{mol/L}$.

Efecte de la producció de proteïna recombinant sobre el metabolisme dels aminoàcids

Els diferents conjunts (*pools*) d'aminoàcids són els subministradors dels “blocs” necessaris per la síntesis de proteïnes. Així doncs, es podria esperar un impacte en els diferents *pools* de la xarxa com a conseqüència de la síntesi de proteïna recombinant. De fet, en diferents estudis previs s'ha demostrat un efecte positiu en la producció de proteïnes recombinants quan es suplementen els medis de cultiu amb una barreja d'aminoàcids [21],[22].

Per tal de poder analitzar aquest impacte en el metabolisme dels aminoàcids de *P. pastoris*, es realitzà una comparació dels diferents *pools* d'aminoàcids lliures entre la soca control i la soca productora Rol_1. Els aminoàcids lliures i de la proteïna cel·lular mesurats per la soca control es prengueren com a referència per a realitzar les comparacions amb la soca productora Rol_1. La Figura 5A es representa la relació entre el *pool* de cada aminoàcid de la soca productora Rol_1 respecte al *pool* corresponent de la soca control. Un quocient superior a 1 significa que l'aminoàcid en qüestió té una abundància relativa major en la soca productora..

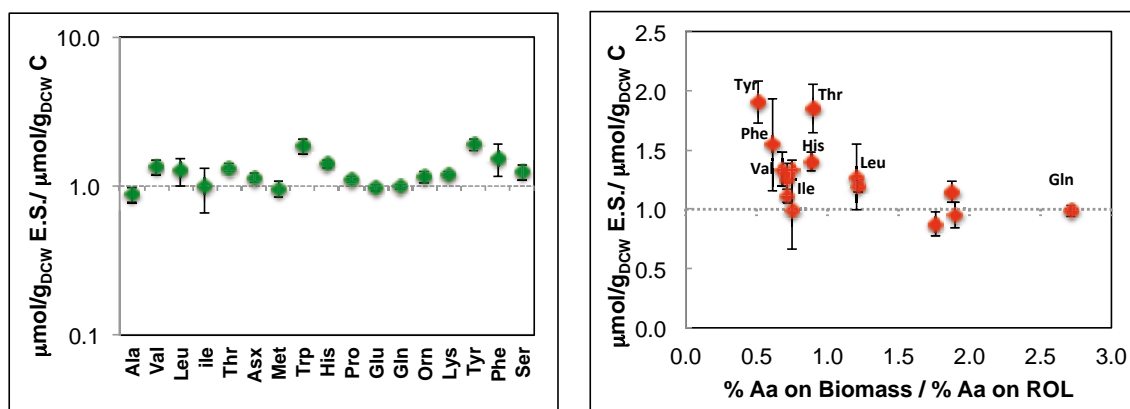


Figura 5. Comparació de l'abundància relativa dels diferents *pools* d'aminoàcids de *P. pastoris* soca control i la soca productora X-33/ROL_1. Els valors presentats són la mitja i les barres representen l'error estàndard de les diferents relacions calculades. A) Representació de les l'abundància relativa d'aminoàcids en la soca productora (E.S) en relació als de la soca control (C) Correspondència entre l'abundància relativa d'aminoàcids lliures presents en la soca E.S. en relació a la soca control vs l'abundància relativa d'aminoàcids de la Rol en relació a composició aminoacídica de la biomassa.

Globalment, es pot observar que hi ha 5 aminoàcids (Thr, Lys, Tyr, His, Trp) els quals presenten concentracions intracel·lulars significativament superiors en la soca productora.

Generalment, un augment en les concentracions dels *pools* d'aminoàcids en soques productes podria ser un indicatiu d'un augment del flux de carboni en aquestes vies de síntesis com a conseqüència de la demanda biosintètica. D'altra banda, aquest increment pot ser requerit per mantenir un flux igual o similar al necessari observat en la soca control. Ara bé, tenint en compte la producció de proteïna per part de la soca Rol_1 i la distribució de fluxos observada no expliquen aquest increment en la concentració intracel·lular d'aminoàcids.

Anàlisi de fluxos metabòlics en condicions de marcatge isotòpic dinàmiques (INST-¹³C-MFA)

La dinàmica de les diferents distribucions d'isotopomers massics (Apèndix 5.3 i 5.4) per les soques productores, segueix el mateix perfil observat prèviament durant el capítol 5 (Figura 8 pàg. 145). Tal i com era d'esperar, l'enriquiment dels diferents intermediaris de la part "inferior" de la xarxa metabòlica, així com dels carbohidrats de reserva (trehalosa) foren més lents comparats amb les cinètiques dels intermediaris de la glicòlisi i les PPP. Tots els intermediaris glicolítics varen assolir un estat isotopomèric estable passats els 10-15 minuts del canvi de substrat no marcat a marcat, temps molt més elevat que el teòricament necessari calculat en base a les diferents concentracions d'aquest metabòlit a l'interior de la cèl·lula i els fluxos metabòlics. Aquest retard, ja descrit al capítol anterior, podria ser explicat pel flux d'intercanvi entre els intermediaris de la glicòlisi i els diferents *pools* de polímers de reserva com ara el glicogen o la trehalosa [23].

El càlcul de la distribució de fluxos i la comparació de resultats durant aquest treball es realitzà en base a la xarxa metabòlica ampliada presentada en el capítol anterior, juntament amb les mesures d'isotopomers massics obtingudes mitjançant les anàlisis de LC-MS i GC-MS (Apèndix 3.1 i 3.2).

Generalment, la distribució de fluxos calculada per les dues soques (Figura 6) fou comparable amb la distribució obtinguda en el capítol 3 utilitzant dades d'aminoàcids proteics obtingudes mitjançant una anàlisi amb NMR. Concretament, aquest estudi ha permès identificar els següents trets diferencials en el fenotip metabòlic de les soques analitzades:

- La major part del flux de carboni provinent de Glc6P es dirigit cap a la via oxidativa de les PPP per totes dues soques; no s'observen diferències estadísticament significatives entre la soca control i la soca productora (77% i 69%, respectivament). Aquests valors son semblants als calculats al capítol 3 amb la metodologia de MFA basada en dades de NMR.
- La majoria del metanol assimilat s'oxida directament a CO₂, mostrant una relació major per el cas de la soca productora (59% vs 53%); poden ser el resultat de la demanda d'energia per la síntesis de proteïna, 2 mol NADH per 1 mol de metanol. Comportament esperat d'acord amb l'observat en el capítol 3.
- La distribució de flux en el cicle de la trehalosa. Tal i com s'observa en la Figura 6, el flux absolut a través del cicle de la trehalosa es significativament superior en la soca productora. Aquest fet es consistent amb els nivells més alts de concentració d'aquest metabòlit mesurats per aquesta soca, fet que ens reafirma el possible reciclatge d'aquesta molècula via un cicle fútil d'ATP [17]. Nivells alts de trehalosa ens podrien confirmar l'increment d'estres ocasionat per el mal plegament de proteïnes.
- L'elevat flux d'intercanvi entre l'oxalacetat, malat, Asp i Glu ens indiquen la capacitat reguladora dels pools d'aminoàcids així com una activitat de la

llançadora Malat/Aspartat [24]. Aquest elevat flux d'intercanvi al voltant d'aquesta part de la xarxa és coherent amb els resultats obtinguts mitjançant la metodologia NMR, on la fracció intacta dels diferents enllaços C₂-C₃ de l'oxalacetat foren pràcticament iguals per tots dos pools, citosòlic i mitocondrial, per aquest metabòlit concret.

- Les dades obtingudes mitjançant MS, clarament suporten una activitat significant de l'activitat de la PDH, sobre un 33% en la soca control i un 41 % en la soca productora, en el transport de ACCoA importat del citosol cap a l'interior de la mitocòndria. D'altra banda, els fluxos al voltant del node del Pyr requereixen una caracterització més detallada, les dades procedents de les dues soques requereixen d'una entrada de material no marcat ¹²C el qual modifica l'enriquiment d'aquet pool en particular.
- El flux a través del TCA ens mostra valors més elevats en el moment que s'expressa proteïna. Tot i que la distribució calcula per totes dues soques no és estadísticament diferent els resultats son coherents amb la demanda de requeriments NADH per la cèl·lula juntament amb el perfil observat durant el capítol 3 d'aquest treball.

És interessant ressaltar que, tal i com es comenta en el capítol anterior, la metodologia MS ens proporciona informació addicional sobre la possible bidireccionalitat de les reaccions proposades en aquest treball. Concretament el flux gluconeogenètic procedent dels pools de DHAP i GA3P cap a la formació de Glc6P fou observat d'acord amb les mesures d'enriquiment de pools observada.

A més a més, tal i com es comprova durant el capítol anterior aquesta possible bidireccionalitat per la soca expressiva resulta ser termodinàmicament possible (Apèndix 5.1 i 5.2).

Els fluxos calculats per la part inferior de la xarxa son menys acurats ja que les transicions a partir del node del Pyr son molt més lentes comparades amb els diferents nodes de la part superior ocasionant un flux d'intercanvi més elevat per tal d'ajustar les diferents mesures, el que provoca errors més elevats i disminueix la possible diferència estadística entre les dues soques.

Globalment, la distribució de fluxos metabòlics en aquest estudi segueix el mateix perfil observat en el capítol 3, corroborant els resultats obtinguts i ampliant el coneixement de diferents punts de la xarxa desconeguts fins el moment.

Requeriments energètics i regeneració de co-factors

Tal i com s'ha comentat al llarg d'aquest treball, els requeriments energètics per el llevat *P. pastoris* foren calculats d'acord amb l'estequiometria plantejada i el valor absolut de les diferents distribucions de fluxos calculades per cadascuna de les soques utilitzades.

La utilització de metanol com a substrat alternatiu juntament amb glucosa, té un impacte en la distribució de flux entre la via glicolítica i la branca oxidativa de les PPP.

Aquest efecte podria ser el resultat d'una demanda extra d'intermediaris per la producció d'equivalent de reducció (NADPH) o com a conseqüència indirecta d'aquesta assimilació el requeriment d'un pool més elevat de Xul5P. És interessant assenyalar que una major quantitat de carboni flueix a través d'aquesta ultima via en la soca expressiva comparat amb la soca control contrari ,tot i que no estadísticament, al comportament observat en el capítol 3 utilitzant ^{13}C MFA procedent d'aminoàcids proteics. En principi, donat que la via de les PPP es considera la principal font de formació de NADPH citosòlic, el flux a través d'aquesta via oxidativa generalment es correlaciona amb la demanda biosintètica de NADPH [25]. No obstant, el fet que la síntesis de Rol ocasiona una disminució del rendiment de biomassa comparat amb la soca control (Taula 1), ens suggereix que aquesta producció extra de NADPH podria ser requerida pels processos de plegament i secreció de la proteïna recombinant. Concretament, aquesta demanda fou de 0.85 ± 0.03 i 0.97 ± 0.07 mmol/g_{DCW}/h per la soca productora i la soca control, respectivament. Aquets valors son inferiors a la quantitat total de NADPH generada per totes dues soques, tot i que les diferències entre els requeriments i la producció no foren estadísticament significatives.

Pel cas de la generació de NADH s'utilitza la mateixa metodologia descrita anteriorment en el capítol 5, amb un resultats de 4.62 ± 3.6 i 4.41 ± 1.47 mmol/g_{DCW}/h (Taula 2) per la soca control i la soca productora, resultats en el mateix rang que els presentats durant el capítol 3. Ara bé, durant l'estudi en el capítol 3 els valors obtinguts per la soca productora foren estadísticament més elevats.

Taula 2. **Requeriment energètics per les soques de *P. pastoris* sota condicions de creixement amb substrat mixt (glucosa/metanol).** Els valors s'expressen en mmol de co-factor/g_{DCW}/h

	<i>X-33 control</i>		<i>X-33 Rol_1</i>		<i>X-33 Rol_3</i>	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
ATP total generat	9.59	3.62	9.37	1.47	10.64	2.77
ATP Fosforilació Oxidativa	7.44	3.62	7.05	1.47	8.46	2.77
ATP manteniment Biomassa	3.23	3.62	4.16	1.47	4.19	2.77
NADH total generat	4.62	3.62	4.4	1.5	5.3	2.8
NADPH total generat	1.10	0.10	1.04	0.16	0.74	0.16
NADPH generat per Biomassa	0.97	0.07	0.86	0.03	0.86	0.03

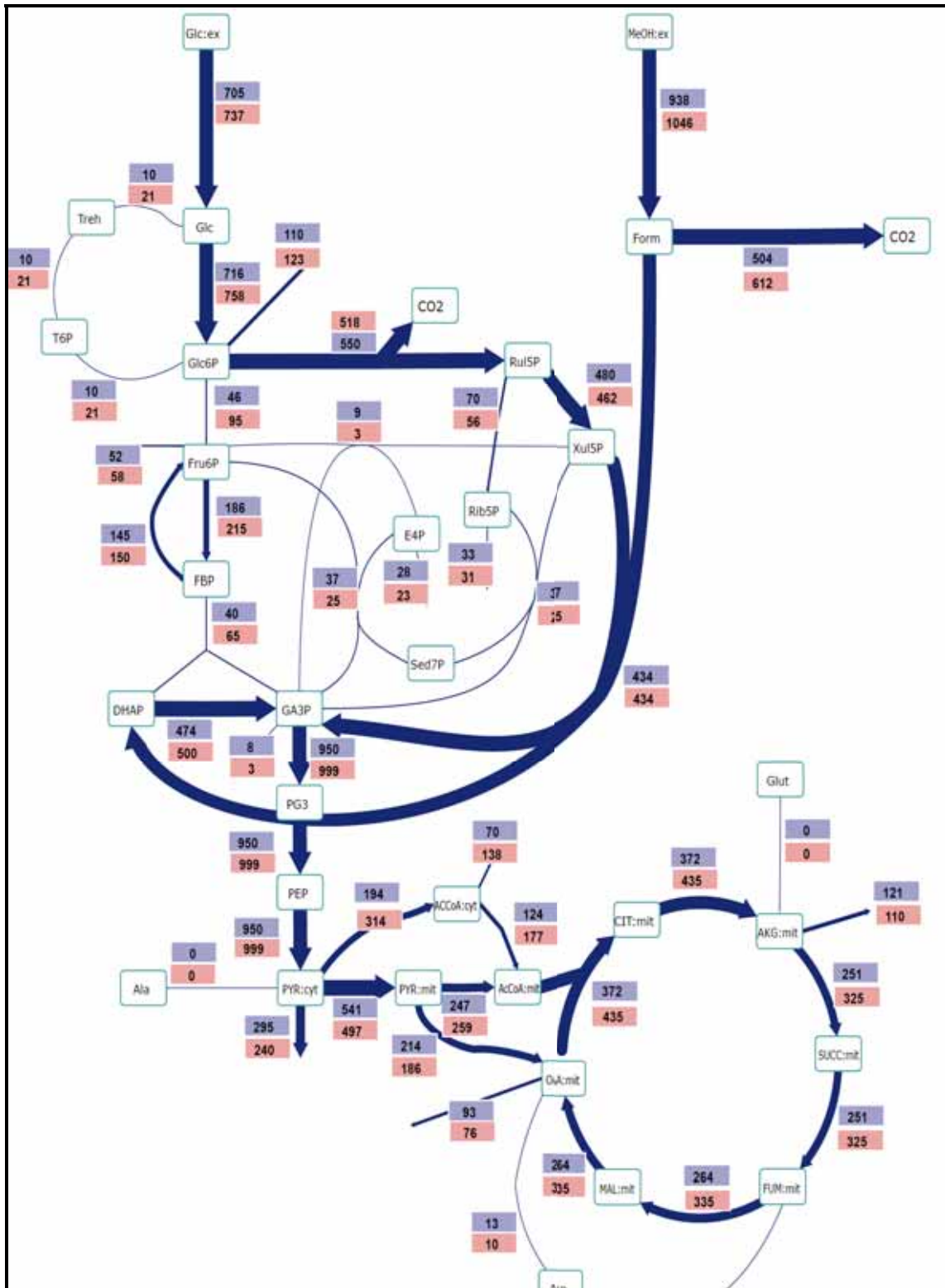


Figura 6. Comparació de la distribució de fluxos metabòlics entre soca control i soca productora (Rol_1), basat en la metodologia de INST-¹³C-MFA. Tots els fluxos s'expressen en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}/\text{h}$. El valor superior (caixes blaves) representa el flux net (en valor absolut) en la soca Control. El valor inferior (caixes rosades) representa el flux net en la soca Rol_1 (en valor absolut). Tots els valors dels fluxos amb els seus errors corresponents estan representats en l'Apèndix 4. El gruix de les fletxes és proporcional al valor dels fluxos, i la direcció de les fletxes indica la direcció del flux net de carboni.

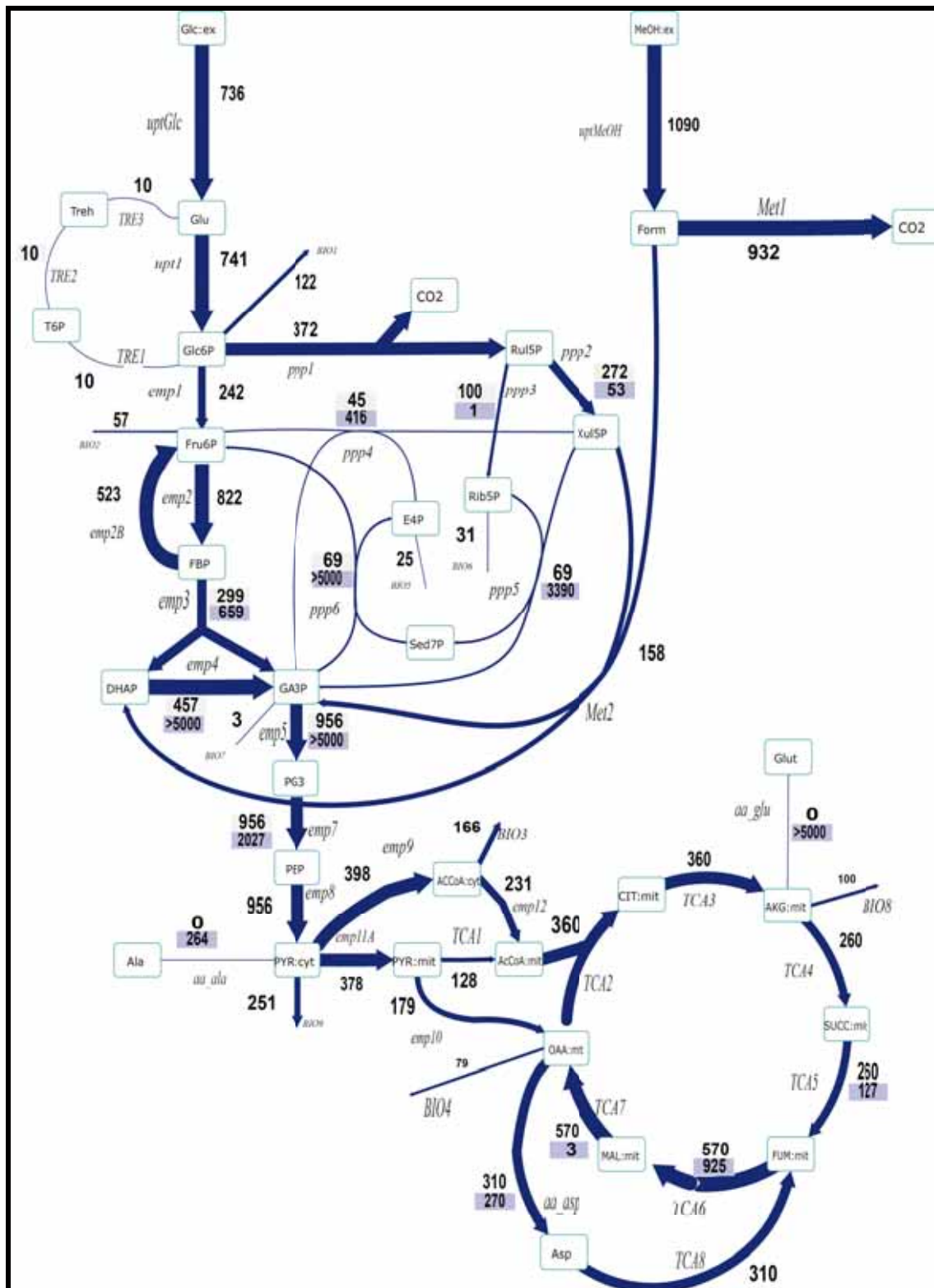


Figura 7. Distribució de fluxos metabòlics en la soca Rol_3, basat en la metodologia d'INST¹³C-MFA . Tots els fluxos son donats en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$. El valor superior representa el flux net en la direcció de les fletxes, el valor inferior representa el valor del flux reversible (en valor absolut). Tots els valors dels fluxos estan representats en l'Apèndix 4.

Finalment, s'han estimat els requeriments d'ATP a partir de la distribució de fluxos anteriorment calculada, juntament amb l'estequiometria de la xarxa definida. A diferència del capítol anterior, hem utilitzat un valor de P/O d'1.61 ATP/molO, estimat a partir del valor mig absolut de la relació P/O obtinguda amb la soca control utilitzant glucosa i metanol com única font de carboni (glucosa: 1.6; metanol: 1.58), (Caspeta comunicació personal). Així doncs, basant-nos en aquest valor, es calculà la quantitat total d'ATP generada per la cèl·lula (Taula 2). Aquest valor es pot separar en dos components, l'ATP generat mitjançant les reaccions de fosforilació a nivell de substrat i el generat per la via oxidativa (respiració). Tal i com s'observa a la Taula 2, la quantitat d'energia generada a través de la via oxidativa representa quasi el 75% del total generat valors semblants als descrits per a *S. cerevisiae* (60%) sota condicions aeròbiques amb glucosa com a substrat limitant [26]. D'altra banda, no s'observaren diferències estadísticament significatives entre les dues soques en termes d'energia generada, tot i que les diferents tendències ens mostren que la soca productora sembla requerir d'una major quantitat d'ATP en relació a la soca control, possiblement com a conseqüència d'un major manteniment cel·lular.

X-33 Rol_3

Un cop avaluat l'efecte de la producció de proteïna recombinant en una soca amb una única copia del gen Rol s'escollí una altra soca amb múltiples còpies d'aquest, X-33/Rol_3 [4],[5], la qual mostrà uns nivells de producció quasi 4 cops més elevats (8302.6 ± 185.3 UA/g_{DCW}). Així doncs, tenint en compte els resultats observats en el capítol 3 d'aquest treball i l'estudi metabolòmic i fluxòmic descrit en la secció anterior d'aquest capítol, s'esperava poder quantificar diferències molt més acusades respecte la soca de referència X-33. Ara bé, el comportament i perfil metabòlic observat en la soca Rol_3 fou totalment inesperat tenint en compte els nivells de producció de proteïna observats.

Així, els nivells de biomassa assolits en els cultius en continu són molt semblants a la soca de referència (Taula 1), contràriament al comportament dels rendiments substrat/biomassa per soques productores de proteïna recombinant [5] i als observats durant aquest treball.

D'altra banda, el resultat de l'anàlisi metabolòmic de la soca Rol_3 no ens mostra un augment dels nivells intracel·lulars de trehalosa, tal i com s'observà en la soca productora Rol_1, sinó tot el contrari: el valor mesurat és inferior fins i tot al de la soca control de referència. Seguint aquesta tendència, els valors dels diferents *pools* d'aminoàcids i metabòlits intracel·lulars són molt similars als mesurats per la soca control (Figura 1-4).

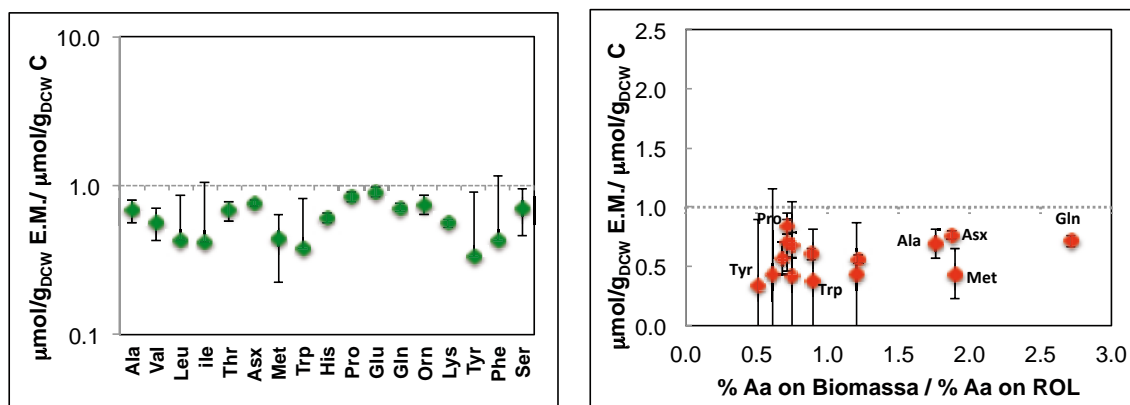


Figura 8. Comparació dels diferents pool d'aminoàcids de *P. pastoris* soca control (C) i la soca productora Rol_3 (E.M.). **A)** Els valors presentats són la mitja i l'error estàndard de les diferents relacions calculades. **B)** Representa les diferents proporcions d'aminoàcids presents en la relació Biomassa/Rol que influeixen en els canvis dels valors d'aminoàcids intracel·lulars mesurats.

Tal i com s'ha realitzat per la soca Rol_1, l'efecte de la producció de proteïna en el contingut d'aminoàcids lliures intracel·lulars fou avaluat per el cas de la soca Rol_3. Tal i com es mostra a la Figura 7A, aquesta soca té un comportament oposat al de la soca Rol_1 ja que les concentracions d'aminoàcids lliures són generalment inferiors als mesurats a la soca control.

fet que podria reflectir l'increment en la demanda d'aminoàcids per la síntesi de Rol. Ara bé, no s'observa cap correlació negativa entre la disminució de les concentracions d'aminoàcids lliures i aquells aminoàcids relativament més abundants a Rol en relació a la proteïna cel·lular, tal i com s'observa en la Figura 7 B).

Pel que fa a la distribució de fluxos metabòlics a la soca Rol_3 (Figura 8), cal ressaltar les següents diferències en relació al fenotip metabòlic de la soca Rol1:

- Una reducció estadísticament significativa del flux de metanol cap a la ruta assimilatòria, és a dir, pràcticament la totalitat del metanol consumit (86 %) es desassimilat directament a CO₂ amb la consegüent producció de NADH, mentre que en la soca Rol_1 aquest valor era del 59 %.
- El cicle de la trehalosa no és veu afectat, mostrant uns valors idèntics als calculats per la soca control.
- El comportament del TCA és situa en la mateixa magnitud que la soca de referència.
- El flux a través de la via de les PPP es veu reduït un 32% respecte la soca Rol_1 amb la consegüent reducció dels diferents pools intracel·lulars dels metabòlits intermediaris d'aquesta ruta metabòlica (Figura 8) juntament amb una disminució de la generació de NADPH (Taula 2)

Globalment, la soca Rol_3 mostra un flux de regeneració de NADH i un valor de manteniment més elevats (tot i que no estadísticament significatius), fet que ens suggereix que la cèl·lula compensa càrrega produïda per la producció de proteïna recombinant mitjançant un reajust metabòlic per tal de generar l'energia necessària per al seu procés de síntesi i secreció.

Sorprenentment, tant els nivells de trehalosa així com el flux metabòlic a través del seu cicle fútil semblen reflectir que les cèl·lules no estarien estressades com a conseqüència de la sobreexpressió de Rol, fet incoherent amb els majors nivells de producció que presenta. El genomes de les soques Rol_1 i Rol_3 han estat recentment seqüenciades. L'anàlisi preliminar de les dades de seqüenciació no mostren cap mutació en cap dels gens (i regions regulatòries dels mateixos) codificadors dels enzims del metabolisme de la trehalosa. Per tant, es pot descartar que les diferències entre soques productores pel que fa al metabolisme de la trehalosa siguin degudes a mutacions en els seus gens corresponents. D'altra banda, un estudi recent en soques recombinants [27] mostra que la co-sobreexpressió d'enzims de la ruta dissimilatòria del metanol (formaldehid deshidrogenasa) permet augmentar la productivitat d'una soca Muts secretora d'una peroxidasa recombinant, fet que seria coherent amb el fenotip metabòlic de la soca Rol_3 i la seva productivitat específica superior en relació a la soca Rol_1.

Conclusions

La metodologia de ^{13}C -MFA emprada en aquest estudi comparatiu entre soques recombinants de *P. pastoris* ha permès un càlcul més acurat dels fluxos metabòlics través d'una xarxa de reaccions bioquímiques més gran que la utilitzada en la metodologia de MFA basada en el marcatge isotòpic d'aminoàcids proteïnogènics (és a dir, en condicions estacionàries). A més, les anàlisis combinades de metabolòmica i fluxòmica ens mostren una coherència termodinàmica de les dades obtingudes. Concretament, aquest anàlisi multi nivell ha permès concloure el següent:

- Existeix un impacte global degut a l'expressió de proteïna recombinant en el metaboloma, concretament, en els nivells intracel·lulars de trehalosa, intermediaris de les PPP i diferents *pools* d'aminoàcids.
- L'impacte observat en el pool de trehalosa és coherent amb un augment del flux a través del seu cicle fútil de despesa d'ATP.
- S'observa un impacte significatiu de la producció de proteïna recombinant sobre la distribució dels fluxos metabòlics, coherent amb els resultats obtinguts al capítol 3. Concretament, s'observa un impacte en les rutes d'assimilació de metanol i en el metabolisme energètic (cicle dels TCA).

La redistribució de fluxos metabòlics observada en les soques productores comporta un lleuger impacte en els paràmetres energètics, que ens suggereixen que les soques productores tenen majors requeriments energètics (per exemple, per a manteniment). La producció extra de NADPH generada per la soca productora i la tendència observada en l'augment de requeriments energètics per el manteniment cel·lular podria ser un clar indicatiu de la càrrega metabòlica ocasionada per l'estrès causat per la sobreproducció de la proteïna recombinant.

Apèndix

Apèndix 1

Reaccions estequiomètriques aplicades a la metodologia ¹³C-MFA per el model utilitzat en aquest capítol. Els valors de CO₂, O₂ i els cofactors no foren utilitzats per la realització del balanç de flux. (totes les reaccions utilitzades en aquest capítol són idèntiques a les descrites durant el capítol 5 Apèndix 1, pàg. 154)

Apèndix 2

2.1 Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars dels diferents aminoàcids en estat estacionari sota les condicions experimentals de la soca Rol_1 i la soca Rol_3. (tots els resultats sobre la soca control són presentats en el capítol 5)

Aminoàcids	X-33 Rol_1				X-33 Rol_3			
	Intra. $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$		Extra. $\mu\text{mol/L}$		Intra. $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$		Extra. $\mu\text{mol/L}$	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
Glu	91.98	4.21	0.03	0.04	85.55	6.11	n.d.	n.d.
Gln	88.40	3.54	26.05	36.68	63.74	3.29	n.d.	n.d.
Asp	45.58	3.58	0.03	0.04	33.21	3.46	1.06	1.20
Orn	28.28	1.75	0.16	0.32	18.36	0.92	1.15	0.48
Ala	13.56	0.71	2.77	3.50	10.63	1.07	1.77	2.50
Lys	12.27	0.44	1.15	1.77	5.73	0.33	0.54	0.29
Ser	9.30	0.38	0.53	0.38	5.23	0.86	0.71	0.36
Asn	9.64	0.39	0.39	0.48	3.59	0.24	0.57	0.38
His	8.13	0.32	0.30	0.43	3.50	0.18	0.19	0.23
Gly	2.35	0.07	2.02	0.87	1.52	0.51	0.50	0.37
Thr	4.24	0.16	0.25	0.04	2.17	0.21	0.33	0.26
Pro	3.85	0.15	0.25	0.16	2.90	0.23	0.21	0.31
Val	2.41	0.17	0.24	0.36	1.02	0.11	0.08	0.31
Leu	1.55	0.22	0.39	0.52	0.53	0.09	0.21	0.31
Ile	0.53	0.11	0.22	0.25	0.22	0.06	0.20	0.32
Tyr	1.02	0.04	0.14	0.20	0.18	0.04	0.04	0.09
Phe	0.65	0.09	0.14	0.20	0.18	0.05	0.10	0.22
Met	0.53	0.04	0.04	0.07	0.24	0.02	n.d.	n.d.
Trp	0.33	0.02	0.08	0.14	0.07	0.01	n.d.	n.d.

Anàlisi multinivell de l'impacte de la secreció de proteïna recombinant en *P. pastoris*

2.2 Concentracions intracel·lulars i extracel·lulars dels diferents metabòlits en estat estacionari sota les condicions experimentals de la soca Rol_1 i la soca Rol_3.

Metabòlits	X-33 Rol_1				X-33 Rol_3			
	Intra. $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$		Extra. $\mu\text{mol/L}$		Intra. $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$		Extra. $\mu\text{mol/L}$	
	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd	Valor	Sd
Treh	49.48	4.69	2.72	1.77	16.34	1.20	1.69	0.50
Glc6P	19.04	1.12	0.27	0.04	10.16	0.61	0.50	0.05
Citrat	6.51	1.60	n.d.	n.d.	7.51	3.50	n.d.	n.d.
Sed7P	7.96	0.79	0.08	0.12	4.55	0.25	0.22	0.04
Fru6P	4.70	0.39	0.18	0.10	2.45	0.13	0.14	0.03
MAL	4.80	0.23	0.30	0.27	4.39	0.50	0.28	0.36
SUCC	1.29	0.15	0.27	0.26	1.54	0.21	0.46	0.20
PG3	1.79	0.08	0.11	0.07	2.00	0.10	0.13	0.12
αKG	3.09	0.48	3.40	0.40	1.25	0.22	0.89	0.39
Pyr	1.57	0.35	36.02	4.29	1.34	0.26	69.04	27.64
Man6P	1.77	0.09	0.06	0.13	1.41	0.09	0.24	0.10
FBP	0.71	0.13	0.12	0.17	0.56	0.13	0.20	0.40
Rib5P	0.85	0.29	0.08	0.01	0.97	0.15	0.27	0.05
Glu	0.48	0.57	15.86	5.54	1.29	1.46	42.57	7.56
FUM	0.88	0.07	0.73	0.16	0.82	0.07	0.34	0.08
Pep	0.88	0.17	0.18	0.10	0.89	0.06	0.10	0.09
DHAP	0.49	0.26	0.02	0.03	0.54	0.09	n.d.	n.d.
Ribu5P	0.29	0.03	0.13	0.14	0.20	0.12	n.d.	n.d.
Xul5P	0.34	0.04	0.05	0.03	0.24	0.12	n.d.	n.d.
PG2	0.22	0.02	0.03	0.03	0.24	0.04	0.04	0.02
T6P	0.26	0.08	0.08	0.07	0.08	0.01	0.11	0.01
E4P	0.19	0.14	0.31	0.23	0.07	0.01	0.37	0.02
IsoCitrat	0.07	0.02	0.02	0.03	0.05	0.01	n.d.	n.d.
GA3P	0.01	0.01	0.02	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

2.3 Concentracions dels diferents nucleòtids i co-factors en estat estacionari sota les condicions experimentals de la soca Rol_1 i la soca Rol_3.

	X-33 Rol_1		X-33 Rol_3	
	Valor	Sd	Valor	Sd
cAMP	0.002	0.002	0.007	0.001
AMP	0.208	0.047	0.327	0.070
ADP	0.865	0.121	0.924	0.100
ATP	8.088	0.787	7.175	0.289
GMP	2.550	2.099	1.702	0.338
GDP	0.171	0.012	0.181	0.022
GTP	1.121	0.030	1.027	0.071
Acetyl CoA	0.212	0.050	0.196	0.028
FAD	1.042	0.064	0.281	0.026
NAD+NADH	60.073	24.322	80.377	31.524
NADP+NADPH	8.979	9.141	9.663	6.470

Capítol 6

Apèndix 3

3.1 fraccions d'isotopomers massics per la soca Rol_1 mesurada durant l'experiment amb ^{13}C .

	temps (h)	0.001	0.003	0.006	0.008	0.011	0.014	0.017	0.019	0.022	0.028	0.033	0.042	0.056	0.083	0.167	0.500	1.000	2.000	3.000	4.000	
FUM	m+0	0.963	0.961	0.963	0.957	0.962	0.958	0.953	0.950	0.951	0.946	0.936	0.923	0.911	0.876	0.769	0.554	0.419	0.316	0.280	0.277	
	m+1	0.033	0.037	0.037	0.040	0.035	0.038	0.044	0.045	0.044	0.048	0.055	0.059	0.065	0.086	0.131	0.212	0.261	0.287	0.290	0.290	
	m+2	0.002	0.000	-0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.014	0.015	0.024	0.059	0.136	0.187	0.230	0.243	0.242
	m+3	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.003	0.004	0.007	0.013	0.034	0.077	0.103	0.124	0.136	0.138
	m+4	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.001	0.007	0.021	0.030	0.042	0.050	0.053
SUCC	m+0	0.964	0.964	0.964	0.964	0.963	0.964	0.963	0.963	0.962	0.960	0.956	0.953	0.944	0.924	0.863	0.686	0.571	0.408	0.377	0.364	
	m+1	0.039	0.038	0.039	0.040	0.041	0.040	0.040	0.040	0.041	0.043	0.045	0.047	0.053	0.066	0.095	0.178	0.219	0.279	0.283	0.284	
	m+2	-0.003	-0.002	-0.003	-0.004	-0.004	-0.003	-0.003	-0.004	-0.003	-0.003	-0.003	-0.001	0.001	0.003	0.009	0.036	0.098	0.143	0.203	0.216	0.223
	m+3	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	0.006	0.032	0.054	0.087	0.098	0.102	
	m+4	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.006	0.013	0.023	0.026	0.027	
MAL	m+0	0.957	0.957	0.955	0.955	0.955	0.950	0.951	0.947	0.942	0.939	0.934	0.922	0.905	0.862	0.750	0.559	0.382	0.314	0.276	0.271	
	m+1	0.041	0.042	0.045	0.044	0.044	0.047	0.048	0.050	0.056	0.057	0.059	0.066	0.077	0.098	0.147	0.229	0.280	0.305	0.312	0.310	
	m+2	-0.001	-0.002	-0.003	-0.001	-0.001	0.000	-0.002	-0.001	-0.001	0.000	0.002	0.005	0.008	0.021	0.054	0.133	0.185	0.224	0.239	0.241	
	m+3	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.003	0.004	0.004	0.007	0.014	0.038	0.052	0.111	0.106	0.118	0.120	
	m+4	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.003	0.004	0.011	0.028	0.041	0.051	0.055	0.058	
αKG	m+0	0.969	0.963	0.963	0.961	0.959	0.963	0.959	0.958	0.966	0.956	0.958	0.969	0.947	0.929	0.873	0.665	0.486	0.320	0.292	0.281	
	m+1	0.029	0.033	0.027	0.033	0.033	0.031	0.035	0.036	0.030	0.035	0.035	0.027	0.045	0.055	0.075	0.149	0.200	0.246	0.241	0.246	
	m+2	-0.007	-0.004	-0.004	-0.005	-0.002	-0.006	-0.003	-0.003	-0.009	-0.001	-0.001	-0.008	0.001	0.010	0.037	0.115	0.176	0.232	0.245	0.240	
	m+3	0.001	0.003	0.004	0.003	0.004	0.003	0.003	0.004	0.001	0.005	0.004	0.005	0.003	0.003	0.009	0.052	0.097	0.137	0.151	0.156	
	m+4	0.008	0.006	0.009	0.007	0.006	0.007	0.005	0.005	0.010	0.004	0.004	0.006	0.003	0.003	0.004	0.016	0.035	0.053	0.059	0.064	
	m+5	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.004	0.007	0.012	0.013	0.014	
PG2	m+0	0.970	0.929	0.866	0.811	0.780	0.743	0.736	0.697	0.672	0.660	0.629	0.597	0.551	0.510	0.472	0.475	0.459	0.461	0.461	0.459	
	m+1	0.027	0.067	0.119	0.177	0.192	0.219	0.226	0.238	0.242	0.230	0.248	0.236	0.246	0.249	0.241	0.235	0.248	0.251	0.234	0.233	

Anàlisi multinivell de l'impacte de la secreció de proteïna recombinant en *P. pastoris*

	m+2	-0.001	-0.002	0.002	0.007	0.013	0.016	0.026	0.030	0.035	0.044	0.054	0.072	0.086	0.116	0.144	0.151	0.151	0.148	0.154	0.148	
	m+3	0.001	0.000	0.002	0.007	0.015	0.023	0.032	0.037	0.039	0.061	0.068	0.069	0.099	0.120	0.135	0.152	0.155	0.157	0.161	0.160	
DHAP	m+0	0.988	0.923	0.827	0.789	0.738	0.714	0.696	0.650	0.611	0.619	0.578	0.533	0.513	0.438	0.404	0.371	0.389	0.388	0.392	0.398	
	m+1	0.036	0.092	0.178	0.210	0.244	0.256	0.259	0.293	0.315	0.281	0.301	0.315	0.286	0.301	0.284	0.289	0.288	0.273	0.281	0.283	
	m+2	-0.023	-0.011	-0.007	-0.002	0.006	0.011	0.022	0.031	0.039	0.050	0.059	0.087	0.111	0.149	0.175	0.180	0.180	0.183	0.182	0.181	
	m+3	-0.002	-0.004	0.002	0.003	0.012	0.019	0.023	0.026	0.036	0.050	0.061	0.065	0.090	0.112	0.137	0.160	0.143	0.157	0.144	0.138	
		m+0	0.981	0.972	0.961	0.940	0.925	0.911	0.893	0.876	0.859	0.834	0.808	0.776	0.738	0.682	0.622	0.604	0.605	0.596	0.591	0.592
Ribu5P	m+1	0.018	0.024	0.033	0.045	0.050	0.057	0.066	0.075	0.083	0.096	0.108	0.123	0.143	0.174	0.221	0.225	0.222	0.227	0.222	0.231	
	m+2	0.001	0.004	0.007	0.016	0.024	0.032	0.041	0.049	0.059	0.070	0.084	0.100	0.119	0.143	0.157	0.171	0.173	0.176	0.177	0.177	
		m+0	0.937	0.919	0.888	0.856	0.825	0.803	0.783	0.761	0.744	0.716	0.691	0.657	0.616	0.567	0.521	0.514	0.509	0.503	0.499	0.501
Fru6P C4-C6	m+1	0.038	0.051	0.076	0.097	0.116	0.128	0.135	0.145	0.151	0.160	0.169	0.179	0.187	0.189	0.193	0.185	0.187	0.188	0.187	0.187	
	m+2	0.024	0.027	0.027	0.029	0.032	0.034	0.037	0.042	0.047	0.053	0.059	0.071	0.087	0.112	0.126	0.129	0.130	0.131	0.135	0.132	
	m+3	0.001	0.003	0.009	0.018	0.027	0.035	0.045	0.051	0.058	0.071	0.081	0.093	0.109	0.132	0.160	0.172	0.175	0.178	0.179	0.180	
		m+0	0.932	0.925	0.909	0.888	0.868	0.842	0.823	0.803	0.783	0.752	0.724	0.689	0.645	0.594	0.544	0.532	0.522	0.519	0.517	0.517
Glc6P C3-C6	m+1	0.036	0.037	0.044	0.054	0.062	0.076	0.085	0.094	0.105	0.117	0.128	0.140	0.150	0.156	0.151	0.147	0.152	0.150	0.152	0.150	
	m+2	0.022	0.023	0.022	0.023	0.022	0.025	0.025	0.029	0.030	0.035	0.041	0.051	0.064	0.082	0.100	0.101	0.102	0.104	0.104	0.105	
	m+3	0.001	0.001	0.001	0.002	0.005	0.006	0.008	0.011	0.013	0.019	0.024	0.032	0.043	0.061	0.083	0.092	0.096	0.097	0.098	0.097	
	m+4	0.010	0.014	0.023	0.033	0.043	0.051	0.058	0.063	0.069	0.077	0.083	0.089	0.097	0.107	0.122	0.128	0.128	0.129	0.130	0.131	
		m+0	0.944	0.941	0.936	0.925	0.912	0.883	0.869	0.849	0.827	0.788	0.751	0.696	0.637	0.543	0.451	0.434	0.432	0.423	0.418	0.421
Sed7P	m+1	0.029	0.039	0.041	0.054	0.064	0.080	0.093	0.103	0.111	0.135	0.151	0.173	0.190	0.209	0.207	0.199	0.203	0.208	0.203	0.202	
	m+2	0.020	0.015	0.016	0.015	0.016	0.021	0.022	0.025	0.029	0.037	0.043	0.054	0.073	0.102	0.133	0.141	0.135	0.137	0.142	0.140	
	m+3	0.001	0.000	0.001	0.001	0.003	0.004	0.006	0.008	0.011	0.016	0.025	0.035	0.052	0.080	0.118	0.129	0.131	0.135	0.137	0.136	
	m+4	0.005	0.004	0.005	0.004	0.006	0.012	0.010	0.015	0.022	0.023	0.031	0.042	0.048	0.065	0.090	0.097	0.098	0.097	0.101	0.101	
		m+0	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.941	0.940	0.941	0.940	0.939	0.936	0.929	0.907	0.843	0.769	0.646	0.547	0.476
Treh	m+1	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.059	0.059	0.061	0.066	0.078	0.112	0.151	0.217	0.270	0.308	
	m+2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.005	0.014	0.025	0.044	0.060	0.071	
	m+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.009	0.017	0.029	0.039	0.046	
	m+4	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.007	0.013	0.022	0.030	0.035
	m+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	
	m+6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.004	0.011	0.019	0.032	0.042	0.049

Capítol 6

FBP C4-C6	m+0	1.010	1.010	0.989	0.952	0.884	0.825	0.844	0.814	0.742	0.776	0.697	0.681	0.660	0.562	0.521	0.491	0.484	0.466	0.455	0.485
	m+1	0.098	0.071	0.099	0.126	0.167	0.208	0.234	0.265	0.230	0.232	0.239	0.246	0.239	0.262	0.248	0.230	0.248	0.252	0.245	0.242
	m+2	-0.103	-0.060	-0.056	-0.077	-0.070	-0.051	-0.091	-0.085	-0.021	-0.054	0.019	0.016	0.013	0.068	0.107	0.127	0.121	0.134	0.146	0.140
	m+3	-0.004	-0.021	-0.033	0.000	0.019	0.019	0.012	0.006	0.049	0.046	0.045	0.057	0.088	0.108	0.124	0.152	0.146	0.148	0.154	0.134
Pyr	m+0	0.944	0.958	0.953	0.939	0.938	0.927	0.931	0.922	0.924	0.915	0.904	0.902	0.876	0.854	0.820	0.794	0.792	0.778	0.788	0.784
	m+1	0.030	0.033	0.039	0.049	0.052	0.062	0.059	0.061	0.064	0.063	0.071	0.068	0.080	0.079	0.099	0.106	0.103	0.109	0.104	0.108
	m+2	0.009	0.006	0.006	0.010	0.007	0.008	0.004	0.010	0.005	0.012	0.015	0.017	0.024	0.041	0.042	0.052	0.063	0.066	0.067	0.067
	m+3	0.017	0.003	0.002	0.002	0.004	0.004	0.005	0.007	0.008	0.010	0.011	0.014	0.020	0.026	0.039	0.038	0.042	0.046	0.042	0.042
Ala	m+0	0.975	0.973	0.972	0.961	0.949	0.940	0.924	0.910	0.900	0.869	0.844	0.810	0.740	0.646	0.525	0.493	0.474	0.442	0.433	0.424
	m+1	0.027	0.029	0.031	0.040	0.051	0.059	0.071	0.082	0.087	0.110	0.123	0.142	0.177	0.212	0.235	0.232	0.240	0.251	0.255	0.258
	m+2	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.001	0.000	0.001	0.003	0.004	0.009	0.014	0.021	0.038	0.070	0.125	0.143	0.149	0.161	0.163	0.166
	m+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.004	0.005	0.008	0.013	0.018	0.027	0.044	0.072	0.114	0.132	0.137	0.146	0.149	0.152
Glu	m+0	0.957	0.957	0.962	0.958	0.956	0.959	0.957	0.953	0.952	0.948	0.946	0.938	0.924	0.901	0.801	0.562	0.380	0.240	0.194	0.187
	m+1	0.046	0.046	0.042	0.047	0.048	0.049	0.045	0.049	0.052	0.053	0.054	0.060	0.069	0.080	0.130	0.207	0.249	0.266	0.269	0.262
	m+2	-0.002	-0.003	-0.005	-0.005	-0.004	-0.009	-0.002	-0.002	-0.003	-0.001	0.001	0.003	0.006	0.017	0.053	0.143	0.208	0.255	0.271	0.273
	m+3	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	0.000	0.002	0.012	0.061	0.112	0.161	0.178	0.184
	m+4	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.004	0.022	0.043	0.063	0.071	0.077
	m+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.005	0.010	0.015	0.017	0.017
Asp	m+0	0.966	0.966	0.967	0.965	0.961	0.963	0.954	0.951	0.946	0.939	0.929	0.913	0.884	0.826	0.674	0.481	0.371	0.294	0.268	0.264
	m+1	0.036	0.036	0.035	0.037	0.040	0.040	0.046	0.049	0.052	0.056	0.064	0.073	0.091	0.120	0.180	0.255	0.290	0.308	0.311	0.310
	m+2	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.004	-0.001	0.000	0.000	0.003	0.003	0.007	0.014	0.030	0.081	0.167	0.209	0.239	0.249	0.250
	m+3	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.003	0.004	0.006	0.011	0.021	0.021	0.062	0.086	0.106	0.116	0.117
	m+4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.013	0.035	0.044	0.053	0.057	0.059

Anàlisi multinivell de l'impacte de la secreció de proteïna recombinant en *P. pastoris*

3.2 fraccions d'isotopomers massics per la soca Rol_3 mesurada durant l'experiment amb ^{13}C .

	temps (h)	0.001	0.003	0.008	0.011	0.014	0.017	0.019	0.022	0.028	0.033	0.042	0.056	0.083	0.167	1.000	4.000	6.000	
Fumarat	m+0	0.964	0.967	0.966	0.964	0.964	0.964	0.963	0.962	0.959	0.952	0.947	0.931	0.894	0.787	0.393	0.253	0.262	
	m+1	0.038	0.035	0.037	0.038	0.039	0.037	0.038	0.040	0.042	0.047	0.049	0.058	0.076	0.127	0.302	0.324	0.315	
	m+2	-0.002	-0.003	-0.003	-0.002	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	0.000	0.002	0.015	0.049	0.188	0.243	0.239	
	m+3	0.000	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.003	0.008	0.013	0.030	0.079	0.123	0.124
	m+4	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.007	0.038	0.058	0.060
Succinat	m+0	0.963	0.966	0.966	0.963	0.963	0.964	0.962	0.960	0.961	0.960	0.956	0.961	0.934	0.831	0.421	0.319	0.337	
	m+1	0.038	0.036	0.035	0.039	0.040	0.038	0.040	0.041	0.040	0.040	0.041	0.039	0.055	0.110	0.293	0.305	0.293	
	m+2	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.003	-0.002	-0.002	-0.001	-0.001	-0.001	0.003	-0.001	0.008	0.049	0.189	0.226	0.220	
	m+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.008	0.077	0.114	0.114	
	m+4	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.021	0.035	0.036	
Malat	m+0	0.962	0.965	0.960	0.965	0.964	0.962	0.962	0.960	0.957	0.949	0.940	0.921	0.882	0.770	0.371	0.221	0.220	
	m+1	0.036	0.033	0.040	0.034	0.035	0.037	0.038	0.040	0.039	0.045	0.051	0.061	0.081	0.131	0.293	0.316	0.323	
	m+2	-0.002	0.000	-0.002	-0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.002	0.000	-0.002	0.002	0.008	0.017	0.053	0.197	0.253	0.251	
	m+3	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.003	0.007	0.006	0.008	0.018	0.037	0.089	0.134	0.137	
	m+4	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002	0.008	0.042	0.066	0.070	
αKG	m+0	0.917	0.995	0.994	0.986	0.994	0.985	0.995	0.981	0.943	0.975	1.277	0.939	0.850	0.435	0.220	0.233	0.430	
	m+1	0.072	0.008	0.015	0.006	0.009	0.008	-0.006	0.007	0.021	0.015	-0.223	0.051	0.091	0.226	0.251	0.243	0.247	
	m+2	-0.007	-0.011	-0.011	-0.008	-0.010	-0.011	-0.008	-0.007	-0.007	-0.006	-0.075	0.007	0.035	0.191	0.252	0.245	0.186	
	m+3	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.002	0.001	-0.004	-0.002	-0.002	0.020	0.000	0.004	0.096	0.176	0.164	0.083	
	m+4	0.015	0.010	0.003	0.018	0.008	0.017	0.019	0.024	0.036	0.017	0.003	-0.001	0.017	0.041	0.074	0.082	0.032	
	m+5	0.002	-0.002	0.000	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.002	0.010	0.002	-0.001	0.004	0.003	0.012	0.026	0.033	0.012	
2PG	m+0	0.921	0.951	0.910	0.866	0.846	0.836	0.786	0.757	0.702	0.639	0.572	0.589	0.483	0.420	0.426	0.417	0.446	
	m+1	0.023	0.021	0.059	0.093	0.108	0.110	0.152	0.187	0.195	0.228	0.265	0.186	0.258	0.231	0.222	0.233	0.220	

Capítol 6

	m+2	0.076	0.016	0.026	0.028	0.026	0.022	0.026	0.034	0.047	0.068	0.091	0.092	0.103	0.163	0.165	0.155	0.142	
	m+3	-0.020	0.012	0.004	0.013	0.020	0.032	0.036	0.022	0.055	0.065	0.071	0.133	0.156	0.187	0.188	0.195	0.192	
3PG	m+0	0.996	0.978	0.938	0.916	0.890	0.858	0.817	0.792	0.720	0.664	0.589	0.532	0.486	0.443	0.444	0.453	0.462	
	m+1	0.003	0.023	0.061	0.075	0.093	0.123	0.142	0.161	0.208	0.248	0.284	0.279	0.246	0.239	0.227	0.219	0.217	
	m+2	-0.010	-0.008	-0.005	0.000	0.001	-0.003	0.012	0.011	0.030	0.039	0.062	0.079	0.133	0.144	0.141	0.137	0.133	
	m+3	0.011	0.006	0.006	0.009	0.016	0.022	0.029	0.035	0.041	0.050	0.065	0.110	0.135	0.173	0.187	0.191	0.189	
FBP C4-C6	m+0	0.974	0.975	0.923	0.913	0.917	0.847	0.788	0.794	0.795	0.701	0.518	0.491	0.524	0.491	0.494	0.496	0.492	
	m+1	0.041	0.048	0.075	0.095	0.101	0.108	0.188	0.162	0.172	0.196	0.226	0.213	0.219	0.228	0.229	0.229	0.222	
	m+2	0.009	-0.021	-0.002	-0.012	-0.047	0.032	0.010	-0.007	-0.051	0.071	0.164	0.113	0.090	0.101	0.108	0.123	0.126	
	m+3	-0.023	-0.003	0.003	0.005	0.030	0.013	0.014	0.051	0.084	0.032	0.091	0.153	0.167	0.180	0.179	0.151	0.170	
	temps (h)	0.001	0.003	0.008	0.011	0.014	0.017	0.019	0.022	0.028	0.033	0.042	0.083	0.167	0.500	1.000	2.000	4.000	6
DHAP	m+0	1.003	1.015	0.977	0.957	0.932	0.893	0.880	0.856	0.830	0.791	0.744	0.610	0.524	0.540	0.501	0.479	0.455	0.452
	m+1	-0.007	-0.007	0.027	0.039	0.051	0.071	0.091	0.108	0.123	0.152	0.163	0.201	0.202	0.190	0.200	0.216	0.228	0.211
	m+2	0.000	-0.009	-0.012	-0.003	0.000	0.008	0.002	0.012	0.014	0.020	0.044	0.108	0.157	0.143	0.155	0.166	0.166	0.177
	m+3	0.004	0.001	0.008	0.007	0.017	0.029	0.026	0.024	0.033	0.037	0.048	0.081	0.117	0.128	0.144	0.138	0.151	0.160
Ribu5P	m+0	0.955	0.970	0.945	0.925	0.917	0.897	0.886	0.870	0.831	0.785	0.764	0.701	0.658	0.635	0.625	0.639	0.617	0.606
	m+1	0.026	0.018	0.026	0.038	0.034	0.048	0.043	0.050	0.075	0.095	0.107	0.148	0.202	0.218	0.216	0.219	0.227	0.229
	m+2	0.019	0.013	0.029	0.036	0.049	0.054	0.071	0.081	0.094	0.120	0.128	0.131	0.130	0.148	0.149	0.132	0.147	0.164
F6P C4-C6	m+0	0.928	0.928	0.906	0.892	0.867	0.845	0.825	0.806	0.762	0.724	0.683	0.566	0.510	0.513	0.500	0.503	0.491	0.488
	m+1	0.027	0.033	0.046	0.051	0.065	0.076	0.090	0.098	0.121	0.142	0.159	0.176	0.184	0.181	0.182	0.179	0.181	0.180
	m+2	0.032	0.037	0.035	0.037	0.040	0.043	0.043	0.046	0.053	0.058	0.068	0.117	0.127	0.120	0.128	0.126	0.133	0.131
	m+3	0.013	0.001	0.013	0.020	0.028	0.036	0.042	0.051	0.064	0.076	0.090	0.141	0.179	0.186	0.191	0.193	0.195	0.201
SED7P	m+0	0.945	0.946	0.937	0.928	0.915	0.904	0.886	0.866	0.829	0.795	0.728	0.526	0.454	0.449	0.442	0.442	0.427	0.425
	m+1	0.030	0.034	0.039	0.045	0.054	0.058	0.071	0.081	0.103	0.118	0.152	0.199	0.226	0.224	0.228	0.228	0.228	0.227
	m+2	0.020	0.016	0.018	0.018	0.020	0.021	0.021	0.024	0.027	0.032	0.047	0.102	0.126	0.123	0.122	0.128	0.126	0.129
	m+3	0.000	0.001	0.000	0.002	0.002	0.004	0.007	0.010	0.016	0.022	0.033	0.079	0.128	0.134	0.134	0.138	0.139	0.140

Anàlisi multinivell de l'impacte de la secreció de proteïna recombinant en *P. pastoris*

	m+4	0.005	0.003	0.005	0.007	0.009	0.012	0.015	0.020	0.026	0.033	0.041	0.094	0.075	0.080	0.074	0.075	0.079	0.079	
Pyr	m+0	0.977	0.977	0.972	0.981	0.984	0.949	0.968	0.950	0.956	0.931	0.919	0.867	0.859	0.833	0.842	0.827	0.828	0.827	
	m+1	0.019	0.022	0.024	0.027	0.024	0.043	0.038	0.045	0.044	0.056	0.065	0.062	0.077	0.083	0.070	0.091	0.096	0.097	
	m+2	0.000	0.000	-0.005	-0.010	-0.009	0.004	-0.009	0.001	-0.006	0.007	0.007	0.056	0.031	0.039	0.058	0.044	0.052	0.050	
	m+3	0.004	0.001	0.010	0.001	0.000	0.003	0.002	0.004	0.005	0.006	0.009	0.015	0.034	0.045	0.029	0.028	0.024	0.027	
	m+0	0.974	0.976	0.975	0.972	0.967	0.963	0.955	0.947	0.931	0.910	0.875	0.709	0.538	0.506	0.495	0.477	0.450	0.444	
Ala	m+1	0.029	0.026	0.027	0.029	0.033	0.036	0.041	0.046	0.057	0.071	0.093	0.172	0.220	0.221	0.226	0.243	0.239	0.241	
	m+2	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.001	0.001	0.002	0.004	0.009	0.050	0.116	0.125	0.128	0.146	0.143	0.144	
	m+3	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.003	0.004	0.006	0.010	0.015	0.023	0.070	0.126	0.149	0.151	0.134	0.168	0.171	
Glu	m+0	0.955	0.954	0.956	0.955	0.954	0.956	0.952	0.951	0.950	0.948	0.941	0.895	0.793	0.546	0.363	0.238	0.177	0.165	
	m+1	0.048	0.047	0.046	0.047	0.048	0.047	0.050	0.049	0.049	0.051	0.057	0.082	0.131	0.208	0.253	0.268	0.261	0.256	
	m+2	-0.003	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	-0.003	-0.002	0.000	0.001	0.001	0.003	0.021	0.059	0.154	0.215	0.258	0.267	0.272	
	m+3	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.002	0.012	0.063	0.117	0.159	0.188	0.193	
	m+4	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.022	0.042	0.061	0.083	0.089	
	m+5	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.006	0.011	0.016	0.023	0.025	
Asp	m+0	0.966	0.966	0.966	0.965	0.965	0.963	0.961	0.959	0.954	0.949	0.938	0.865	0.720	0.469	0.338	0.257	0.220	0.212	
	m+1	0.036	0.036	0.037	0.036	0.037	0.038	0.040	0.041	0.044	0.048	0.055	0.093	0.154	0.241	0.282	0.311	0.297	0.295	
	m+2	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.001	0.000	0.000	0.002	0.021	0.069	0.161	0.211	0.238	0.251	0.254	
	m+3	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.003	0.005	0.018	0.046	0.096	0.126	0.142	0.166	0.171	
	m+4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.011	0.032	0.044	0.052	0.065	0.069	
	temps (h)	0.001	0.003	0.008	0.011	0.014	0.017	0.019	0.022	0.028	0.033	0.042	0.056	0.083	0.167	0.500	1.000	2.000	4	6
G6P C3-C6	m+0	0.927	0.929	0.906	0.890	0.872	0.851	0.828	0.806	0.771	0.733	0.693	0.692	0.574	0.539	0.536	0.525	0.528	0.517	0.514
	m+1	0.035	0.033	0.042	0.049	0.056	0.068	0.079	0.089	0.108	0.127	0.136	0.128	0.153	0.178	0.174	0.178	0.174	0.177	0.177
	m+2	0.025	0.025	0.024	0.023	0.023	0.025	0.027	0.030	0.034	0.041	0.052	0.044	0.091	0.091	0.089	0.091	0.089	0.092	0.093
	m+3	0.002	0.000	0.002	0.004	0.006	0.007	0.010	0.013	0.019	0.024	0.033	0.022	0.069	0.097	0.101	0.103	0.106	0.106	0.108
	m+4	0.011	0.012	0.026	0.034	0.042	0.049	0.055	0.061	0.069	0.075	0.086	0.115	0.114	0.096	0.101	0.102	0.103	0.107	0.108

Capítol 6

	m+0	0.940	0.943	0.944	0.943	0.943	0.944	0.944	0.945	0.944	0.942	0.943	0.945	0.922	0.880	0.797	0.691	0.531	0.333	0.211
	m+1	0.058	0.055	0.055	0.057	0.056	0.056	0.056	0.055	0.056	0.057	0.056	0.049	0.071	0.093	0.137	0.191	0.274	0.377	0.441
	m+2	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.006	0.002	0.008	0.018	0.033	0.056	0.081	0.098
TRE	m+3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001	0.001	0.005	0.013	0.024	0.039	0.058	0.070
	m+4	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	-0.002	0.002	0.004	0.011	0.020	0.033	0.050	0.060
	m+5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.005	0.010	0.018	0.026	0.031
	m+6	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.003	0.008	0.018	0.031	0.050	0.074	0.089

Apèndix 4

4.1 Resultats de la distribució per la soca Rol_1 de fluxos després de l'anàlisi ¹³C-INST. Tots els valors estan en mmol/g_{DCW}.h⁻¹

<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>	<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>
aa_ala_fwd	0.485	0.031	feedGlcB_fwd	0.148	0.000
aa_ala_bwd	0.485	0.031	feedGlcC_fwd	0.590	0.006
aa_asp_bwd	0.140	0.230	feedMeOHB_fwd	1.046	0.021
aa_asp_fwd	0.150	0.230	Met1_fwd	0.612	0.261
aa_glu_bwd	37.777	12.000	Met2_fwd	0.217	0.130
aa_glu_fwd	37.777	12.000	Met2B_fwd	0.217	0.130
bio1_fwd	0.123	0.006	Met3_fwd	0.434	0.260
bio2_fwd	0.058	0.003	Met4_fwd	0.434	0.260
bio3_fwd	0.138	0.002	ppp1_fwd	0.518	0.160
bio4_fwd	0.076	0.005	ppp2_bwd	0.231	0.109
bio5_fwd	0.023	0.002	ppp2_fwd	0.693	0.021
bio6_fwd	0.031	0.001	ppp3_bwd	0.024	0.103
bio7_fwd	0.003	0.000	ppp3_fwd	0.080	0.026
bio8_fwd	0.110	0.010	ppp4_bwd	0.866	0.104
bio9_fwd	0.240	0.017	ppp4_fwd	0.869	0.087
CO2out1_fwd	2.277	0.378	ppp5_bwd	0.094	0.133
emp1_bwd	1.429	0.078	ppp5_fwd	0.119	0.083
emp1_fwd	1.525	0.075	ppp6_bwd	2.066	0.300
emp10_wd	0.186	0.074	ppp6_fwd	2.090	0.091
emp11_fwd	0.001	0.015	TCA1_fwd	0.259	0.136
emp11A_fwd	0.497	0.205	TCa2_fwd	0.435	0.205
emp11B_fwd	0.239	0.021	Tca3_fwd	0.435	0.128
emp11C_fwd	0.987	0.130	Tca4_fwd	0.163	0.090
emp11D_fwd	0.987	0.130	Tca4B_fwd	0.163	0.090
emp12_fwd	0.177	0.160	Tca5_bwd	0.010	0.150
emp2_fwd	0.215	0.120	Tca5_fwd	0.172	0.120
emp2B_fwd	0.150	0.120	Tca5B_fwd	0.172	0.120
emp3_bwd	0.191	0.171	Tca5B_fwd	0.010	0.150
emp3_fwd	0.257	0.019	Tca6_bwd	0.212	0.637
emp4_bwd	4.107	0.374	Tca6_fwd	0.547	0.220
emp4_fwd	4.602	0.360	Tca7_bwd	3.441	2.668
emp5_bwd	3.757	3.201	Tca7_fwd	3.777	2.700
emp5_fwd	4.752	3.200	Tca8_fwd	0.010	0.261
emp6_bwd	7.439	4.801	TRE1_fwd	0.021	0.006
emp6_fwd	8.434	4.800	TRE2_fwd	0.021	0.006
emp7_bwd	0.074	0.452	TRE3_fwd	0.021	0.006
emp7_fwd	1.069	0.440	upt1	0.758	0.000
emp8_fwd	0.999	0.100	upt2	1.046	0.021
emp9_fwd	0.314	0.160	uptGlc	0.737	0.006

4.2 Resultats de la distribució per la soca Rol_3 de fluxos després de l'anàlisi ^{13}C -INST. Tots els valors estan en $\text{mmol/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}^{-1}$

<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>	<i>flux</i>	<i>valor</i>	<i>sd</i>
aa_ala_bwd	0.264	0.042	feedGlcB_fwd	0.147	0.000
aa_ala_fwd	0.264	0.042	feedGlcC_fwd	0.589	0.006
aa_asp_bwd	0.270	0.248	feedMeOHB_fwd	1.090	0.010
aa_asp_fwd	0.580	0.170	Met1_fwd	0.932	0.593
aa_glu_bwd	43.555	27.000	Met2_fwd	0.079	0.297
aa_glu_fwd	43.555	27.000	Met2B_fwd	0.079	0.297
bio1_fwd	0.122	0.007	Met3_fwd	0.158	0.593
bio2_fwd	0.057	0.003	Met4_fwd	0.158	0.593
bio3_fwd	0.140	0.003	ppp1_fwd	0.372	0.064
bio4_fwd	0.084	0.006	ppp2_bwd	0.053	0.201
bio5_fwd	0.016	0.002	ppp2_fwd	0.325	0.012
bio6_fwd	0.055	0.001	ppp3_bwd	0.001	0.202
bio7_fwd	0.006	0.000	ppp3_fwd	0.101	0.027
bio8_fwd	0.067	0.005	ppp4_bwd	0.416	0.222
bio9_fwd	0.214	0.021	ppp4_fwd	0.460	0.097
CO2out1_fwd	2.270	0.094	ppp5_bwd	3.390	1.217
emp1_bwd	1.093	0.041	ppp5_fwd	3.459	1.200
emp1_fwd	1.335	0.048	ppp6_bwd	6.603	1.414
emp10_wd	0.179	0.201	ppp6_fwd	6.672	1.400
emp11_fwd	0.001	0.021	TCA1_fwd	0.128	0.202
emp11A_fwd	0.378	0.093	Tca2_fwd	0.360	0.202
emp11B_fwd	0.250	0.010	Tca3_fwd	0.360	0.202
emp11C_fwd	0.988	0.093	Tca4_fwd	0.130	0.101
emp11D_fwd	0.988	0.064	Tca4B_fwd	0.130	0.101
emp12_fwd	0.231	0.010	Tca5_bwd	0.064	0.008
emp2_fwd	0.822	0.230	Tca5_fwd	0.194	0.078
emp2B_fwd	0.523	0.321	Tca5B_fwd	0.194	0.128
emp3_bwd	0.659	0.502	Tca5B_fwd	0.064	0.128
emp3_fwd	0.958	0.310	Tca6_bwd	0.925	0.892
emp4_bwd	119.387	190.000	Tca6_fwd	1.495	0.850
emp4_fwd	119.844	190.000	Tca7_bwd	0.003	0.296
emp5_bwd	19.392	7.100	Tca7_fwd	0.573	0.120
emp5_fwd	20.348	7.100	Tca8_fwd	0.310	0.180
emp6_bwd	14.414	3.106	TRE1_fwd	0.005	0.006
emp6_fwd	15.369	3.100	TRE2_fwd	0.005	0.006
emp7_bwd	2.027	1.118	TRE3_fwd	0.005	0.006
emp7_fwd	2.983	1.100	upt1	0.741	0.000
emp8_fwd	0.956	0.201	upt2	1.090	0.010
emp9_fwd	0.398	0.008	uptGlc	0.736	0.006

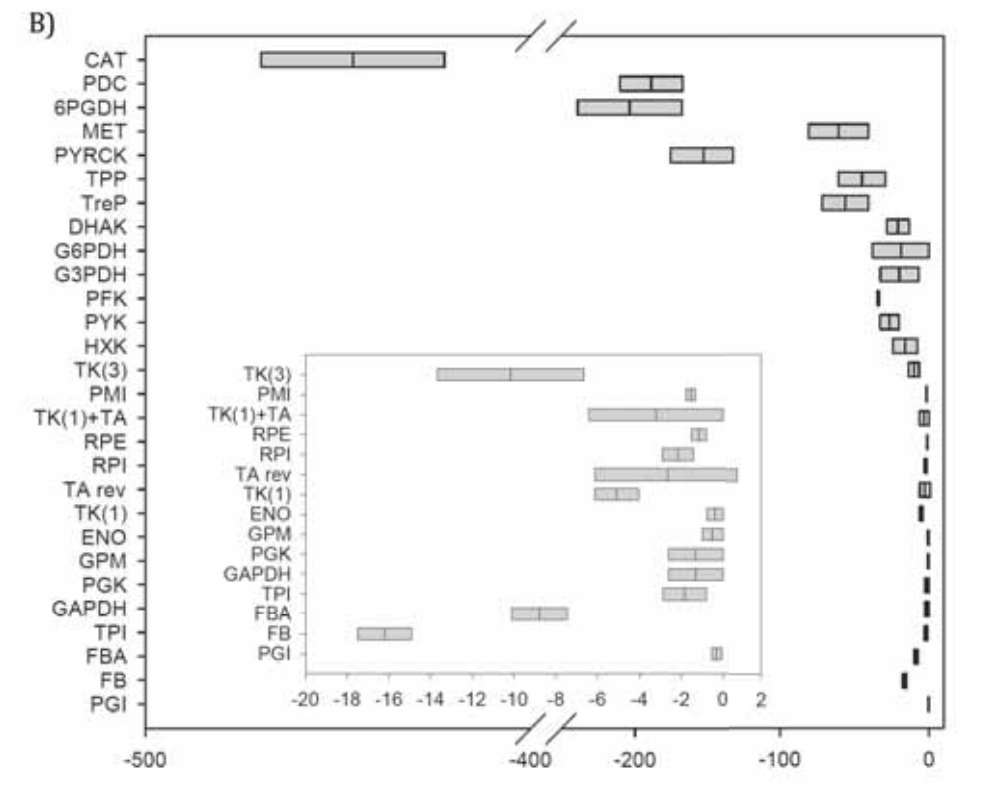
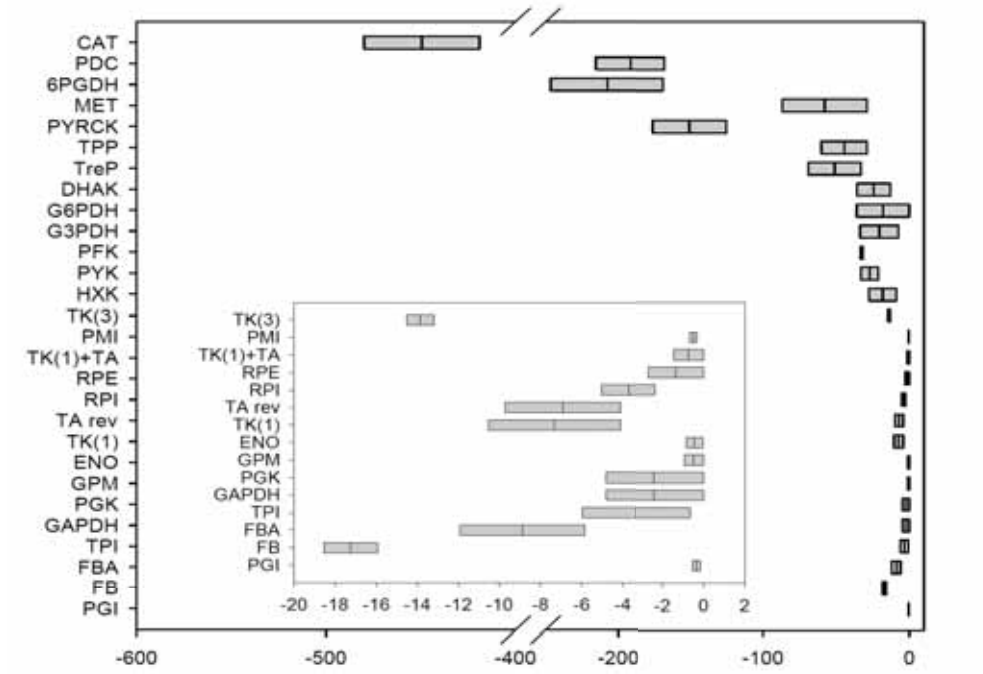
4.3 Resultats de les diferents concentracions estimades durant la simulació per la soca Rol_3 i Rol_1. Tots els valors estan en $\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}^{-1}$

Paràmetres estimats ($\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$) Rol_1					
Metabòlits	Valor	Sd	Metabòlits	Valor	Sd
Form	2.51	1.3	MeOH_ext	0.91	2.4
GAP	0.0064	0.79	MeOH_int	0.069	0.96
DHA	0.248	0.48	OAA_mit	0.13	3.3
ACCoAmit	0.452	3.2	CO2	0.038	8.2

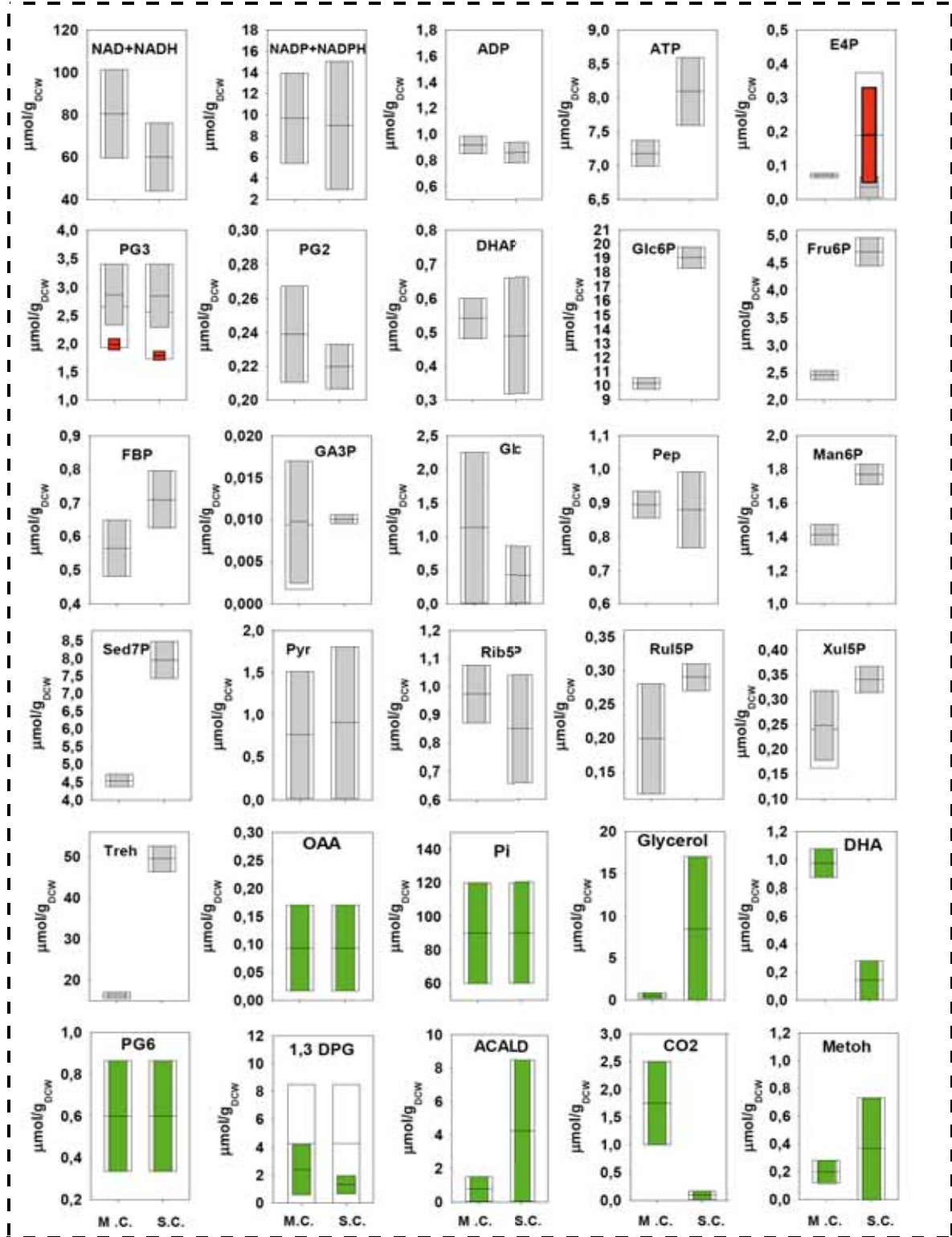
Paràmetres estimats ($\mu\text{mol/g}_{\text{DCW}}$) Rol_3					
Metabòlits	Valor	Sd	Metabòlits	Valor	Sd
Form	6.28	15	MeOH_ext	3.14	18
GAP	0.006	1.7	MeOH_int	0.3	9.1
DHA	0.348	0.48	OAA_mit	0.16	5.9
ACCoAmit	0.42	5	CO2	0.072	25

Apèndix 5

5.1 Energia lliure de Gibbs de les reaccions del citosol per a *P. pastoris* sota condicions de creixement amb glucosa/metanol com a font de carboni per les soques Rol_1 i Rol_3. A) Representa els valors calculats per la soca Rol_3, B) Representa els valors calculats per la soca Rol_1.

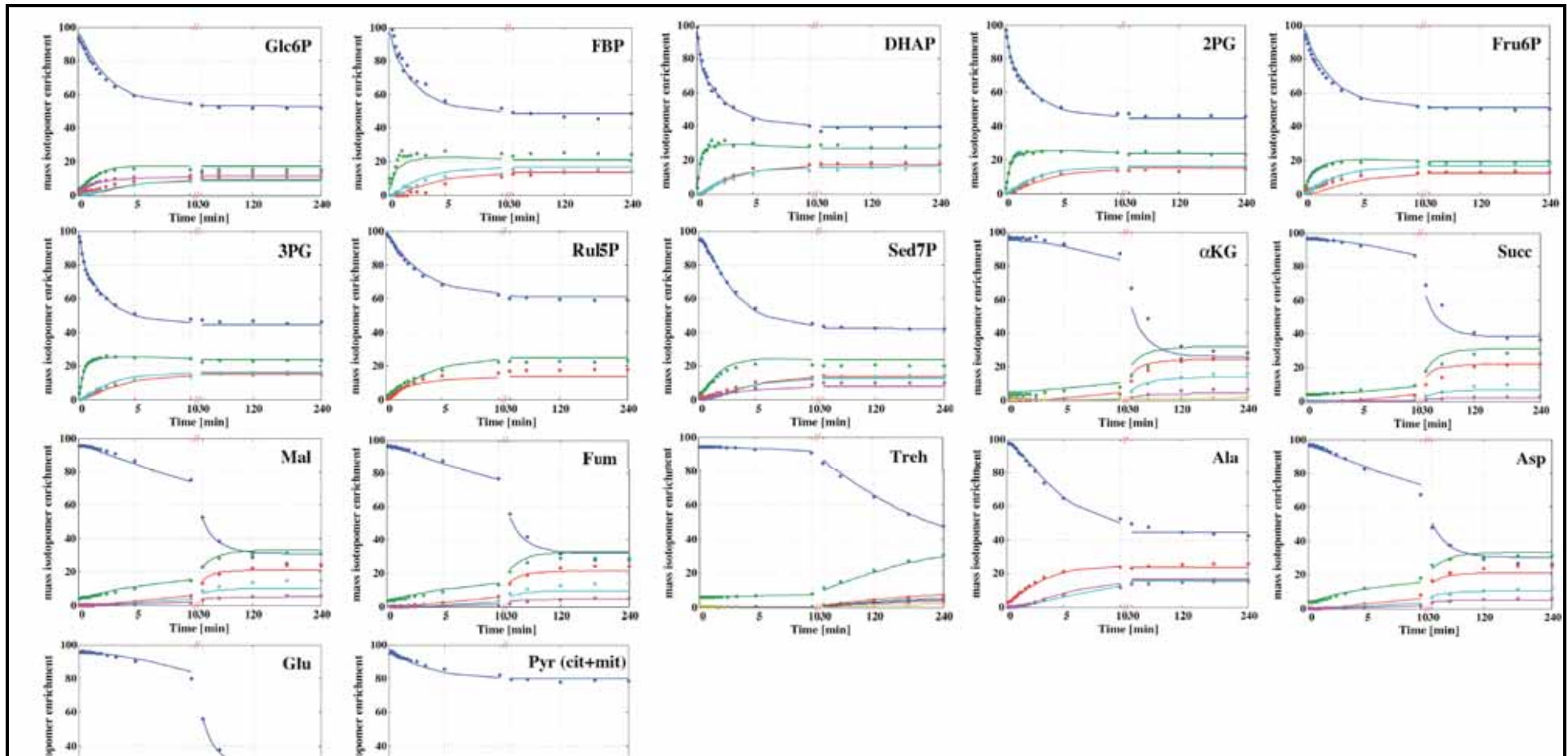


5.2 Rang de concentracions dels metabòlits mesurats i rang més probable dels metabòlits no mesurats. La barres en blanc representen el rang prèviament considerat per el càlcul, les barres amb gris representen el rang corregit per el programa (metabòlits mesurats) i les barres amb verd (metabòlits no mesurats) representen els rangs de valors possibles d'acord amb les restriccions termodinàmiques aplicades per el programa. Si existeix una quantificació errònia d'algun metabòlit , el rang original mesurat (barres amb vermell) i els rangs de concentració avanç i després de l'anàlisi NET es mostren conjuntament.

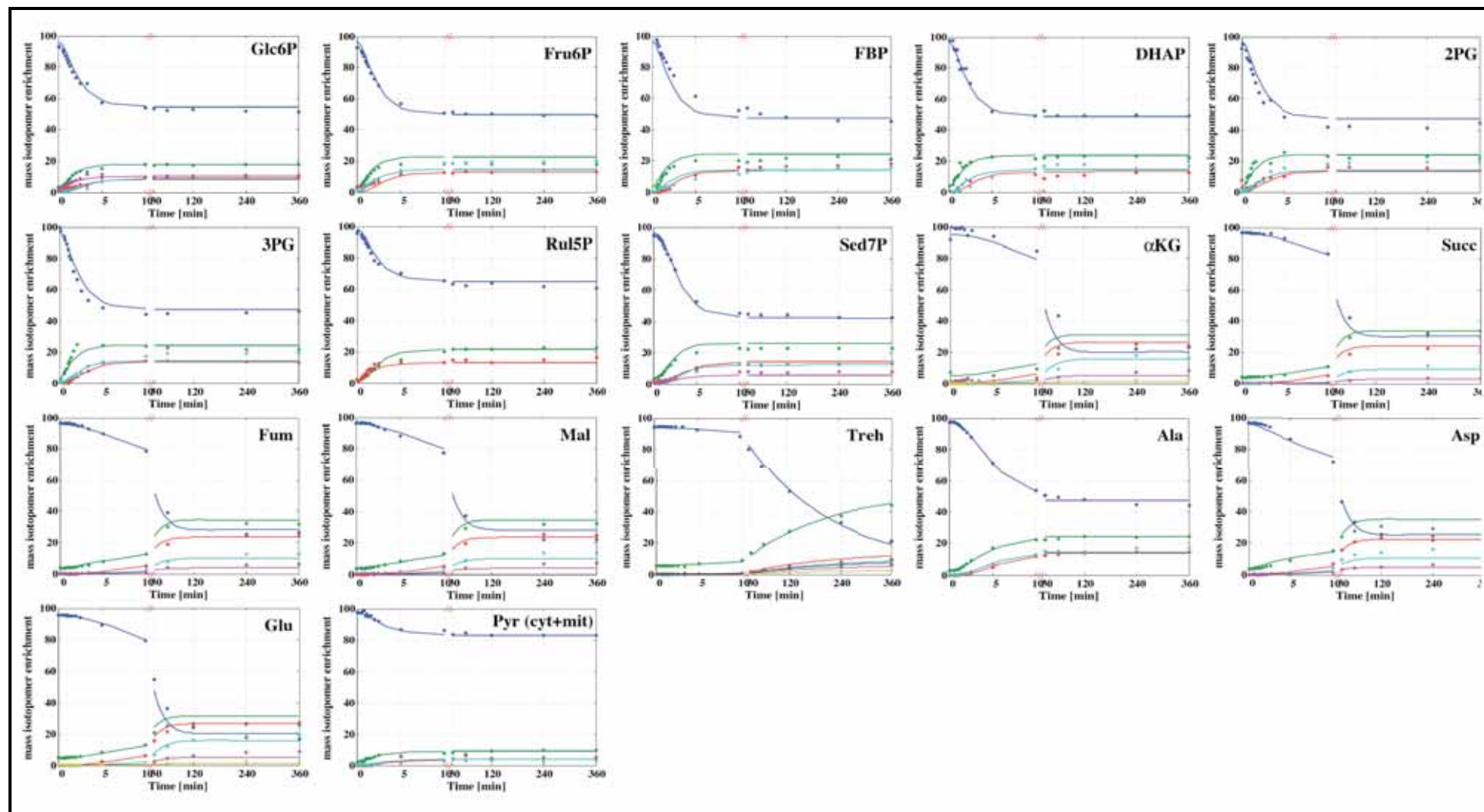


Capítol 6

5.3 Distribució dinàmica dels isotòmers massius dels metabòlits principal de *P. pastoris* en cultius amb continu després del canvi de medi ^{12}C a ^{13}C per la soca Rol_1. Els punts experimentals estan representats en cercles sòlids. Línies contínues reflecteixen la simulació amb la millor estimació de flux utilitzant el model descrit en el capítol anterior.



5.4 Distribució dinàmica dels isotopomers massics dels metabòlits principal de *P. pastoris* en cultius amb continu després del canvi de medi ^{12}C a ^{13}C per la soca Rol_3. Els punts experimentals estan representats en cercles sòlids. Línies contínues reflecteixen la simulació amb la millor estimació de flux utilitzant el model descrit en el capítol anterior.



Bibliografia

1. Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solá C, Schmid RD, Valero F: **Optimization of the high-lipase activity of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2001, **86**:59–70.
2. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler a Y, Madden KR: ***Pichia pastoris* as a host system for recombinant protein production.** *Molecular and Cellular Biology* 1985, **5**:3376–3385.
3. Higgins DR, Busser, K., Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ, Hoeffler JP: **Small Vectors for Overexpression of a Rhizopus oryzae Lipase Gene in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Copies of its Gene.** In *Pichia Protocols*. edite by Merten O-W Kluwer Academi 2001, **103**:41–53.
4. Serrano A, Cereghino G, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of its gene.** In *Recombinant protein production in eukaryotic cells. A comparative view on host physiology*. edited by Merten O-W Kluwer Academi 2001, **103**:41–53.
5. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F: **Combined effect of the mutant phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology* 2005, **116**:321–335.
6. Lange HC, Eman MR, Van Zuijlen G, Visser D, Van Dam JC, Frank J, De Mattos MJ, Heijnen JJ: **Rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*.** *and Bioengineering* 2001, **75**:406–415.
7. Carnicer M, Canelas AB, Pierick A, Zeng Z, Dam J, Albiol J, Ferrer P, Heijnen JJ, Gulik WM: **Quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*.** *Metabolomics* 2011, **8**:284–298.
8. Canelas AB, Ras C, Pierick A, Dam JC Van, Heijnen JJ, Gulik WM Van: **Leakage-free technique for yeast metabolomics.** *Metabolomics* 2008, **4**:226–239.
9. Wahl SA, Dauner M, Wiechert W: **New Tools for Mass Isotopomer Data Evaluation in 13C Metabolomics: Mass Isotope Correction, Data Consistency Checking, and Precursor Relationships.** *Bioengineering* 2004, **3**:259–268.
10. Wiechert W, Wurzel M: **Metabolic isotopomer labeling systems Part I: global data analysis.** *Mathematical Biosciences* 2001, **169**:173–205.
11. Carnicer M, Pierich A Ten, Dam J Van, Heijnen JJ, Albiol J, Gulik W Van, Ferrer P: **Metabolomics analysis of amino acid metabolism in recombinant *Pichia pastoris* under different growth and availability conditions.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:83.
12. Wang NS, Stephanopoulos G: **Application of macroscopic balances to the identification of measurement errors.** *Biotechnology and Bioengineering* 1983, **25**:2177–2208.
13. Heijden V Der, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KC: **Linear Constraint Reaction Systems: I. Classification of the Calculability and the Balanceability of Chemical Reaction Systems.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**:3–10.
14. Verheijen PJT: **Data Reconciliation and Error Detection.** In *The Metabolic Pathway Engineering*. edited by Smoke C CRC Press; 2010, **8**:8.1–8.13.
15. Kümmel A, Panke S, Heinemann M: **Systematic assignment of thermodynamic constraints to metabolic network models.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:512.

16. Zamboni N, Kümme A, Heinemann M: **anNET: a tool for network-embedded thermodynamic analysis of quantitative metabolome data.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:199.
17. Parrou JL, Teste MA, François J: **Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose.** *Microbiology (Reading, England)* 1997, **143 (Pt 6)**:1891–900.
18. François J: **Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2001, **25**:125–145.
19. Resina D, Bollok M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P: **Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:21.
20. Cornelissen BG, Bertelsen H, Lenz K, Hahn B, Schultz M, Scheffler U, Werner E, Leptien H, Krüü S, Jansen A, Elsholz O, Gliem T, Wilhelm B, Sowa E, Radeke HH, Luttmann R: **Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris* in Integrated Processing.** 2003, **3**:361–370.
21. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A: **Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **107**:357–368.
22. Görgens J, Van Zyl W, Knoetze J, Hahn-Hägerdal B: **The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium.** *Biotechnology and Bioengineering* 2001, **73**:238–45.
23. Aboka FO, Heijnen JJ, Van Winden W a: **Dynamic 13C-tracer study of storage carbohydrate pools in aerobic glucose-limited *Saccharomyces cerevisiae* confirms a rapid steady-state turnover and fast mobilization during a modest stepup in the glucose uptake rate.** *FEMS Yeast Research* 2009, **9**:191–201.
24. Bakker BM, Overkamp KM, AJ van M, Kötter P, Luttik MA, JP van D, Pronk JT: **Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2001, **25**:15–37.
25. Blank LM, Lehmbeck F, Sauer U: **Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:545–558.
26. Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H: **Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**:60.
27. Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A: **Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11**:22.

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi fou desenvolupar i aplicar noves eines i metodologies per a l'anàlisi metabòlic del llevat *P. pastoris* per tal de conèixer millor l'efecte de l'expressió d'una proteïna recombinant sobre el seu metabolisme.

Durant els últims anys, la comunitat científica ha invertit esforços importants per a intentar descriure de manera sistemàtica i quantitativa el comportament metabòlic de microorganismes de rellevància industrial mitjançant diferents tècniques analítiques basades amb marcatge isotòpic de substrats i modelització matemàtica, com a base per a la seva millora racional (enginyeria metabòlica). En aquest context, la meua contribució ha estat centrada en l'estudi de l'impacte ocasionat per la producció d'una proteïna recombinant utilitzant com a font de carboni diferents substrats multicarbonats com la glucosa o glicerina juntament amb metanol.

Les diferents tècniques d'anàlisi i modelització desenvolupades en el transcurs dels anys 90' i 00', han permès realitzar un pas important cap a la comprensió del comportament metabòlic dels diferents microorganismes. Avui dia, existeixen diferents tipus de models metabòlics els quals ens permeten obtenir una idea de la distribució del carboni alimentat per tal d'obtenir el producte desitjat. Així doncs, podem utilitzar un model a escala genòmica, el qual inclou la totalitat de reaccions bioquímiques conegudes que tenen lloc en una cèl·lula [1][2] o models reduïts d'una part o mòdul de la xarxa metabòlica [3][4]. Ambdós models poden ser utilitzats per avaluar l'efecte de diferents canvis genètics o ambientals sobre el comportament cel·lular. Ara bé, l'anàlisi quantitatiu de les diferents distribucions de fluxos intracel·lulars a través de la xarxa de reaccions bioquímiques, mitjançant tècniques de marcatge isotòpic amb ^{13}C està actualment reduït al metabolisme central del carboni, és a dir, fa ús de models metabòlics reduïts.

Determinació de fluxos metabòlics utilitzant restriccions locals derivades d'anàlisi de dades ^{13}C -NMR d'aminoàcids proteics

Donat que *P. pastoris* és un llevat metilotròfic, i que el sistema d'expressió de proteïnes recombinants en *P. pastoris* està fonamentalment basat en l'ús del promotor *AOXI*, regulat per metanol, els bioprocessos corresponents utilitzen metanol o barreges de metanol i un substrat multicarbonat com a fonts de carboni. El fet d'utilitzar metanol com a substrat auxiliar així com d'inductor de la producció de proteïna, ha estat un repte en el disseny dels experiments de marcatge amb ^{13}C i el posterior càlcul de distribucions de fluxos. Així, els resultats obtinguts derivats de l'anàlisi mitjançant la metodologia NMR mostraren patrons de marcatge ^{13}C diferents als mesurats utilitzant glucosa com única font de carboni [5]. A més, la co-assimilació d'un substrat d'un sol carboni com ara el metanol, té un clar impacte en la traçabilitat d'enllaços ^{13}C - ^{13}C a través de les reaccions de la xarxa metabòlica, sobre la qual és basa la metodologia d'anàlisi de quocients de fluxos metabòlics en punts locals de la xarxa. En conseqüència, ha calgut formular noves equacions alternatives per a determinar localment (en bifurcacions o punts de confluència de rutes metabòliques) la contribució de flux de cadascuna de les rutes (és a dir, els quocients de fluxos metabòlics), utilitzades posteriorment com a restriccions matemàtiques en el càlcul MFA [6]. L'expansió del formalisme matemàtic per al càlcul de quocients de fluxos

metabòlics per al cas de co-assimilació de glucosa i metanol ha permès analitzar la distribució de fluxos entre una soca control i dues soques productores d'una lipasa recombinant. Aquesta anàlisi també ha permès la possibilitat de calcular els requeriments energètics derivats de l'adaptació de les cèl·lules a la utilització de substrats mixtes (en relació a cèl·lules creixent sobre glucosa com a única font de C) i la càrrega metabòlica addicional possiblement derivada de l'estrès causat per la síntesi i/o secreció de la proteïna recombinant [7]. Així doncs, tot i que no s'observa un redireccionament de fluxos de carboni envers la síntesi de la proteïna recombinant, les anàlisis realitzades han permès quantificar un impacte limitat però estadísticament significatiu sobre el metabolisme energètic resultant de la producció de la proteïna recombinant. Donat que nivells d'expressió d'aquesta proteïna son força reduïts, aquests resultats semblen indicar que aquesta càrrega metabòlica està relacionada amb l'estrès cel·lular que causa durant el procés de plegament i secreció [7].

Determinació de fluxos metabòlics mitjançant ajust iteratiu global de dades de marcatge ^{13}C -NMR d'aminoàcids proteics

Un cop avaluada la impossibilitat d'estendre el formulisme desenvolupat en el bloc de treball anterior al cas de l'anàlisi de fluxos metabòlics per al cas de barreges de substrats glicerina/metanol, s'ha cregut convenient explorar altres aproximacions metodològiques que permetin extreure informació útil de dades de ^{13}C -NMR per al càlcul de fluxos metabòlics. La glicerina és un co-substrat àmpliament utilitzat en bioprocessos de producció de proteïnes recombinants amb *P. pastoris*, el qual ha adquirit una rellevància creixent a resultes del seu abaratiment, ja que és un subproducte industrial de les plantes de producció de biodièsel. Així, en el capítol 4 s'utilitzaren totes les dades procedents de marcatge ^{13}C d'aminoàcids proteics [8] i es realitza un rastreig de patrons de marcatge fins als seus principals metabòlits precursors amb la finalitat d'utilitzar una metodologia d'ajust iteratiu global de fluxos metabòlics amb el programa de simulació ^{13}C Flux2, recentment desenvolupat [9].

Con a cas d'estudi, s'utilitzaren un conjunt de dades de ^{13}C -NMR corresponents a cultius de *P. pastoris* operats en continu a diferents velocitats de dilució i barreges glicerina/metanol. Aquests son dos paràmetres que tenen un fort impacte sobre productivitats específiques i volumètriques dels bioprocessos [10]. Els resultats obtinguts ens mostraren que la taxa de dilució té un clar impacte en el reajust de la xarxa metabòlica per tal de subministrar tots els requeriments necessaris pel creixement de la cèl·lula. Concretament, elevades taxes de dilució requereixen d'una demanda més elevada d'energia per acomplir les necessitats de síntesi de biomassa, manteniment o producció de proteïna. En canvi, les diferents relacions de glicerina/metanol a una determinada taxa de dilució només mostren petites variacions en la distribució de fluxos.

Anàlisi metabòlica quantitativa i anàlisi de fluxos metabòlics basat en dades de marcatge ^{13}C en condicions dinàmiques de metabòlits i aminoàcids lliures

Degut a la complexitat estructural (compartimentalització subcel·lular) i metabòlica que presenten les cèl·lules eucariòtiques és de gran importància la quantificació del màxim de paràmetres possibles per tal de realitzar un càlcul de fluxos metabòlics el més ajustat a la realitat possible. En aquesta tesi s'ha analitzat quantitativament per primer cop el metaboloma de *P. pastoris* sota condicions de co-assimilació d'un substrat multicarbonat com la glucosa, amb metanol. Aquesta quantificació, juntament amb una distribució de fluxos basada en un model dinàmic de marcatge ^{13}C ha permès el càlcul de fluxos metabòlics sobre una xarxa metabòlica ampliada respecte a la definida inicialment durant la primera part d'aquest treball. A més, es verificà la consistència termodinàmica dels fluxos obtinguts així com la seva direccionalitat en relació al les concentracions de metabòlits intracel·lulars. Cal destacar que el perfil dels fluxos calculats utilitzant una metodologia d'enriquiment isotòpic dinàmic fou coherent amb els calculats utilitzant restriccions (equacions de relacions de fluxos) derivades de dades de ^{13}C -NMR d'aminoàcids proteics. A més, aquesta metodologia ens ha permès observar un impacte significatiu de la producció recombinant de proteïnes en altres rutes metabòliques més enllà de les considerades en el bloc inicial d'aquest treball, concretament en el metabolisme de la trehalosa.

Aquesta metodologia també ha permès calcular dels requeriments energètics d'una soca productora en relació a la soca control. No obstant, tot i que la tendència dels valors ens mostren una major velocitat de producció de NADH i uns requeriments per el manteniment ATP majors en la soca productora de proteïna recombinant, aquestes diferències no son estadísticament significatives. Tot i així, son coherents amb els mateixos càlculs realitzats a partir de les distribucions de fluxos metabòlics obtingudes durant el primer bloc d'aquest treball. Així doncs, aquest increment en els requeriments de despesa energètica de la soca productora podria ser indicatiu del reajust metabòlic per a compensar l'estrès ocasionat per la síntesi i secreció de la proteïna recombinant, tot i que calen experiments addicionals per a confirmar aquesta tendència d'una forma més segura.

Treballs futurs.

Aquest treball proporciona una base metodològica i és un punt de partida per a l'estudi del comportament metabòlic de *Pichia pastoris* en condicions de producció. Per exemple, proposaria aplicar aquestes metodologies a l'estudi i caracterització d'una sèrie de soques productores amb dosis creixents del gen recombinant (és a dir, amb capacitat de síntesi de proteïna recombinant creixent), o bé fent estudis multifactorials on s'estudii de manera sistemàtica l'impacte de paràmetres com la velocitat de creixement i la utilització de diferents fonts de carboni amb co-assimilació amb metanol.

A més a més, proposaria l'ús dels fluxos metabòlics calculats experimentalment com a restriccions per al càlcul de fluxos metabòlics mitjançant models metabòlics, i posterior simulació i predicció de dianes per a millora genètica de soques productores.

Bibliografia

1. Chung BKS, Selvarasu S, Camattari A, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee H, Lee D: **Genome-scale metabolic reconstruction an in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement.** *Microbial Cell Factories* 2010;50–65.
2. Caspeta L, Shoaie S, Agren R, Nookaew I, Nielsen J: **Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in-silico evaluation of their potentials.** *BMC Systems Biology* 2012, **6**:24.
3. Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H: **Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A.** *BMC Systems Biology* 2008, **2**:60.
4. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A: **Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010, **107**:357–368.
5. Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, Graf AB, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P: **A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**:141.
6. Maaheimo H, Fiaux J, Cakar ZP, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T: **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (¹³C) labeling of common amino acids.** *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2001, **268**:2464–2479.
7. Resina D, Bollok M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P: **Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:21.
8. Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Szyperski T, Ferrer P: **Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol / methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates.** *Microbiology* 2007:433–448.
9. Weitzel M, Nöh K, Dalman T, Niedenfür S, Stute B, Wiechert W: **13CFLUX2 High Performance Software Suite for ¹³C-Metabolic Flux Analysis.** *Bioinformatics* 2012:1–3.
10. Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F: **Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review.** *Microbial Cell Factories* 2006, **5**:17.

Contribucions científiques

Articles científics

Jordà J., Joughten P., Càmara E., Maaheimo H., Albiol J., Ferrer P.: Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose/methanol mixtures. *Microbial Cell Factories*. 2012; 11:57.

Jordà J., Suarez C., Carnicer M., Pietrich A., Heijnen J., Gulik W., Ferrer P., Albiol J., Wahl A.: Glucose-Methanol co-utilization in *Pichia pastoris* studied by metabolomics and instationary ^{13}C flux analysis. *BMC Systems Biology*. 2013; 7:17.

Jordà J., Santos De Jesus S., Peltier S., Ferrer P., Albiol J.: Metabolic flux analysis of recominant *Pichia pastoris* growing on diferent glicerol/methanol mixtures by iterative fitting of NMR-derieved ^{13}C -labellind data from proteinogenic amino acids. *New Biotechnology* (under revision).

Jordà J., Suarez C., Carnicer M., Pietrich A., Heijnen J., Gulik W., Ferrer P., Albiol J., Wahl A.: Quantitative metabolomics and instationary ^{13}C -metabolic Flux Analysis reveals impact of recombinant protein production on trehalose and energy metabolism in *P. pastoris*. *Metabolomics* (under revision).

Pòsters

Jordà J. Joughten P. Maaheimo H. Ferrer P. Albiol J.: Investigation the potential interactions between enrgy metabolism and recombinant protein production in *Pichia pstoris* by ^{13}C -based metabòlic flux analysis. The 14th European Congress on Biotechnology. Barcelona, Spain.2009.

Jordà J. Joughten P. Maaheimo H. Ferrer P. Albiol J.: Interactions between energy and recombinant protein production in *Pichia Pastoris* by ^{13}C -based metabòlic flux analysis. 4th Conference of Phisiology of Yeast and Filamentous Fungy (PYFF). Rotterdam, The Netherlands. 2010.

Presentacions orals

Jordà J. Suarez C. Carnicer M. Pierich A. Heijnen J. Gulik W. Ferrer P. Albiol J. Wahl A.: Quantitative metabolomics and instrationary ^{13}C -Metabolic Flux Analysis reveals impact of recombinant protein productions on central carbon metabolism of *P. pastoris*. RPP7-Laupheim, German. March-2013.